

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE VETERINARIA**  
**Departamento de Medicina y Cirugía Animal**



**IMPACTO DEL ESTRÉS TÉRMICO Y DEL DAÑO  
NUCLEAR ESPERMÁTICO EN LA VIABILIDAD  
EMBRIONARIA Y EN LA PROPORCIÓN DE  
SEXOS EN EL RATÓN.**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**  
**PRESENTADA POR**

**Miriam Pérez Crespo**

Bajo la dirección del doctor

Alfonso Gutiérrez Adán

**Madrid, 2010**

- **ISBN: 978-84-693-1840-9**

**Universidad Complutense de Madrid**

**Facultad de Veterinaria**

**Departamento de Medicina y Cirugía Animal**



**IMPACTO DEL ESTRÉS TÉRMICO Y DEL DAÑO NUCLEAR  
ESPERMÁTICO EN LA VIABILIDAD EMBRIONARIA Y EN LA  
PROPORCIÓN DE SEXOS EN EL RATÓN**

**Director de la Tesis**

**Alfonso Gutiérrez Adán**

**Miriam Pérez Crespo**

**Madrid, 2009**





Dr. Alfonso Gutiérrez Adán, con DNI 13751214-C Investigador Titular del Departamento de Reproducción Animal y Conservación de Recursos Zoogenéticos, del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) hace constar:

Que la Tesis Doctoral titulada: **“Impacto del estrés térmico y del daño nuclear espermático en la viabilidad embrionaria y en la proporción de sexos en el ratón”**, ha sido realizada por Dña. Miriam Pérez Crespo, Lcda.en Veterinaria, bajo mi dirección y que tras su revisión, considero que tiene la debida calidad para su presentación y defensa.

Madrid, 4 de Febrero de 2009

VºBº Director

Fdo: Alfonso Gutiérrez Adán



Este trabajo ha sido realizado gracias a la concesión y disfrute de una Beca Predoctoral de Formación de Personal Investigador, financiada por el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) del Ministerio de Ciencia e Innovación.



**A mi familia**





## **AGRADECIMIENTOS**

A todas las personas que de una u otra manera han participado o contribuido en el desarrollo de este trabajo:

Al Dr. Alfonso Gutiérrez Adán, director de este trabajo, por haberme dado la oportunidad de trabajar en el laboratorio, por intentar siempre transmitirme su entusiasmo por la ciencia, por motivarme para la presentación de los resultados en congresos nacionales e internacionales y por su apoyo en la publicación de los mismos.

A la Dra. Belén Pintado, por estar siempre dispuesta a enseñarme tantas y tantas cosas, por resolver las múltiples dudas que se me planteaban y, especialmente, por su apoyo en los momentos más difíciles.

Al Dr. Pedro Moreira, por su colaboración en el tercer trabajo de esta tesis y en otros experimentos, pero sobre todo, por su amistad.

A mis compañeros de laboratorio: Eva, Juande, Miguel, Pablo, Raúl y Sandra.

En este grupo siempre he podido encontrar el apoyo necesario para seguir adelante en esas situaciones que toda tesis conlleva. Cuando llegué, Raúl, tú ya estabas, me ayudaste con mis primeras PCR; durante todo este tiempo, me has enseñado muchas cosas, fundamentalmente, lo importante que es el orden en el laboratorio. Luego, llegaste tú Miguel; aunque no hemos tenido muchos experimentos en común, has aportado mucho a mi formación predoctoral y muy especialmente, he sentido tu cercanía en las situaciones, que para mí, han sido más delicadas. Nunca voy a olvidar tus lecciones para relativizar las pequeñas dificultades. Muchas lecciones me has dado tú también, Eva y muchos ánimos cuando más los necesitaba; eres una excelente compañera de trabajo, pero sobre todo, una gran amiga. Más tarde, llegaron las nuevas incorporaciones, vosotros, Pablo y Juande. Mi agradecimiento a tí, Pablo, por estar siempre dispuesto a resolver muchas de mis dudas y por haberme ayudado en algunas de las situaciones más estresantes. A tí, Juande, gracias por tu continuo apoyo en la fase de escritura de esta Tesis Doctoral, sin duda la más dura. Tú siempre has estado ahí, aunque estuvieras lejos del laboratorio, sugiriéndome cómo mejorarla y revisándola. Siempre he podido contar con tu apoyo moral; sólo gracias a tí he podido sobreponerme a los momentos más complicados. ¡Muchas gracias por tu inmensa paciencia! Por último, a tí, Sandra, por aportar tu alegría al grupo, por hacer que el ambiente de trabajo junto a tí sea tan agradable y por estar siempre dispuesta a aprender.

A todos, una vez más, ¡Gracias de todo corazón!

A mis compañeras del animalario: Bárbara, Gema, María, Mari Luz, Raquel y Toñi. Con vosotras he pasado algunos de los momentos más divertidos. Siempre he confiado en vosotras para que me ayudarais con los experimentos y además de esa ayuda, me habéis brindado generosamente vuestra amistad fuera del trabajo.

A mis compañeros del departamento: María, Paula, Miguel A. Coloma y Celia.

Gracias a todos porque sin vosotros no hubiera sido lo mismo. A vuestro lado he pasado momentos inolvidables tanto dentro como fuera del departamento.

A Alicia y Tere, por compartir conmigo tan buenos momentos; aunque vuestra visita al laboratorio fue fugaz, me dejasteis una huella imborrable.

Al Dr. José Félix Pérez Gutiérrez, profesor titular del departamento de Medicina y Cirugía Animal de la Facultad de Veterinaria. Gracias porque tus consejos me ayudaron a decidir que quería realizar una tesis doctoral en el área de reproducción animal.

Al Prof. Patrick Lonergan y al Dr. Dimitrios Rizos, por haberme dado la oportunidad de realizar una estancia en Lyons Research Farm (University College Dublin, Irlanda) con el fin de aprender y perfeccionar las técnicas de fecundación *in vitro* en bovino, así como por haberme prestado su ayuda.

Al Dr. James Murray y la Dra. Elisabeth Mega, gracias por el recibimiento en el laboratorio de Biología Molecular de la Universidad de Davis (California, EEUU) y la oportunidad que me brindaron de aprender importantes técnicas de biología molecular.

A la Dra. María Teresa Cutuli, profesora titular del departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria, por ser la primera persona que me acercó al mundo de la investigación cuando estudiaba la carrera. Sin ese primer empujón, quizá esta Tesis Doctoral no sería una realidad.

Por último, pero no por ello lo menos importante, a mis amigos y a mi familia por estar siempre ahí; sin vuestro apoyo este trabajo no hubiera sido posible. Muchas gracias por la paciencia que habéis demostrado durante este larguísimo período en el que no he

podido estar tanto con vosotros como hubiera querido; a partir de ahora, ya no volveréis a oír la misma cantinela “estoy ocupada con la Tesis”.

Papá, miles de gracias por haber sido tan paciente, por haberme permitido dedicar tantísimas horas a la realización y escritura de esta Tesis. Aunque no te lo creas, sí, ya está acabada. Mamá, gracias; tus ánimos y cercanía cuando más lo necesitaba, me han ayudado y alentado a seguir en esta carrera de fondo. Finalmente, gracias tía Mari Luz, por darme esos consejos tan válidos que me ayudaron a decidir y, finalmente, elegir este camino.



# ÍNDICE

## RESUMEN

## SUMMARY

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>9</b>
<b>3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>13</b>
3.1. Fecundación y desarrollo embrionario preimplantacional en el ratón	14
3.2. Dimorfismo sexual de los embriones durante el desarrollo preimplantacional	15
3.3. Control de la proporción de sexos en mamíferos	17
3.4. Efecto del estrés térmico sobre el desarrollo embrionario preimplantacional	20
3.5. Consecuencias del estrés térmico escrotal en la espermatogénesis y en el desarrollo embrionario	21
3.6. Importancia del daño nuclear espermático en la fecundación y en el desarrollo embrionario y fetal	26
<b>4. CAPÍTULO I. La expresión del gen glucosa-6-fosfato deshidrogenasa participa en la diferente sensibilidad de los embriones de ratón de distinto sexo al estrés oxidativo promovido por calor</b>	
Differential Sensitivity of Male and Female Mouse Embryos to Oxidative Induced Heat Stress is Mediated by Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Gene Expression (2005)	
<i>Molecular Reproduction and Development</i> 72(4):502-510	
4.1. Resumen	41
4.2. Diseño experimental	43
4.3. Manuscrito	51
<b>5. CAPÍTULO II. Efecto del estrés térmico escrotal sobre la viabilidad e integridad del ADN de los espermatozoides murinos y la proporción de sexos de la descendencia</b>	
Scrotal Heat Stress Effects on Sperm Viability, Sperm DNA Integrity and the Offspring Sex Ratio in Mice (2008) <i>Molecular Reproduction and Development</i> 75(1): 40-47	
5.1. Resumen	63
5.2. Diseño experimental	65
5.3. Manuscrito	69

**6. CAPÍTULO III. Los factores liberados por espermatozoides con la membrana plasmática dañada afectan a la integridad del ADN espermático y a la implantación de los embriones que producen**

Factors from damaged sperm affect its DNA integrity and its ability to promote embryo implantation in mice (2008) *Journal of Andrology* 29(1): 47-54

6.1. Resumen .....	79
6.2. Diseño experimental .....	81
6.3. Manuscrito .....	85
7. DISCUSIÓN .....	95
8. CONCLUSIONES .....	107
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	111
ANEXO I. ABREVIATURAS .....	131
ANEXO II. ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS .....	135
ANEXO III. PUBLICACIONES .....	139







## RESUMEN

El estrés térmico y la fragmentación del ADN espermático son dos factores muy influyentes en la fertilidad de los animales domésticos. El estrés térmico afecta tanto a la calidad embrionaria como a la calidad seminal. Sin embargo, en lo que respecta al desarrollo embrionario, no se conoce con precisión cómo afecta a los estadios tempranos de desarrollo y si los embriones de diferente sexo pueden responder de distinta forma al citado estrés. En cuanto a los gametos masculinos, se conoce muy poco cómo el estrés térmico puede afectar la calidad espermática, y las consecuencias que puede desencadenar en los embriones resultantes de la fecundación con estos gametos. Uno de los parámetros a tener en cuenta cuando se habla de calidad espermática es la fragmentación del ADN de los espermatozoides (una de las consecuencias del estrés térmico); no se conoce de forma precisa la relación existente entre este parámetro y la capacidad fecundante de los espermatozoides ni los efectos que para el desarrollo embrionario puede tener.

En este trabajo se planteó, en primer lugar, conocer cuáles son las diferencias en la susceptibilidad al estrés térmico entre embriones de distinto sexo durante el desarrollo preimplantacional y determinar cuáles son los mecanismos moleculares responsables de las citadas diferencias; en segundo lugar, determinar cómo el estrés térmico puede alterar tanto el desarrollo embrionario preimplantacional (*in vivo* e *in vitro*) así como la espermatogénesis, utilizando como modelo experimental el ratón; y en tercer lugar, averiguar qué condiciones pueden favorecer un aumento en el porcentaje de espermatozoides con ADN fragmentado y las consecuencias sobre el desarrollo embrionario y fetal, ya sea tras la utilización de la monta natural o mediante una técnica de reproducción asistida, como es la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI). Para abordar estos objetivos, se diseñaron tres ensayos.

En el primer ensayo se analizó el efecto del estrés térmico sobre embriones producidos *in vitro* e *in vivo*; utilizando, por una parte, embriones cultivados *in vitro*, y por otra parte, aplicando el estrés térmico sobre las hembras en los primeros días de gestación (*in vivo*). En primer lugar se analizó la supervivencia de los embriones de sexo masculino y femenino tras la aplicación del estrés térmico *in vitro*, observándose un incremento en la supervivencia en los embriones de sexo femenino. Otra de las diferencias observadas entre embriones de distinto sexo cultivados *in vitro* bajo las citadas condiciones, fue su velocidad de desarrollo; los embriones de sexo masculino se desarrollaron más rápidamente que los de sexo femenino. Con el fin de evaluar cuáles pueden ser las causas de la diferente supervivencia entre embriones de distinto sexo, se procedió a determinar la concentración relativa de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en embriones en estadio de mórula sometidos a estrés térmico *in vitro*, y posteriormente se analizó el sexo de los mismos, observándose que en los embriones de sexo masculino la concentración relativa de  $H_2O_2$  era superior a la observada en los embriones de sexo femenino sometidos al estrés térmico. Por otra parte, otro grupo de embriones fue cultivado *in vitro* a 37°C hasta el estadio de blastocisto, determinándose el sexo de los mismos y la abundancia relativa del ARNm de genes importantes

en el desarrollo embrionario. Se observó que la expresión de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (*G6pdx*), un gen ligado al cromosoma X y relacionado con el estrés oxidativo, era mayor en los embriones de sexo femenino. Como hipótesis a contrastar, se planteó que la mayor supervivencia de los embriones de sexo femenino en estadios de desarrollo temprano, ante situaciones de estrés térmico, era debida a un aumento en la expresión *G6pdx* a diferencia de lo que ocurre en los embriones de sexo masculino. Para evaluar el posible efecto protector frente al estrés térmico de la actividad G6PD, se inhibió esta enzima a través de la utilización de dehidroepiandrosterona (DHEA). Se comprobó que, tras la inhibición de G6PD, las diferencias inicialmente observadas entre embriones de distinto sexo cultivados *in vitro* y causadas por el estrés oxidativo provocado por el aumento de temperatura, desaparecían. Se demostró experimentalmente que G6PD interviene en los mecanismos por los cuales los embriones de sexo femenino, en estadios preimplantacionales, son más resistentes que los de sexo masculino ante situaciones de estrés térmico.

En el segundo ensayo, se eligió también el estrés térmico como factor ambiental con impacto sobre la fertilidad de los animales. En este caso, el estrés térmico fue aplicado de forma local sobre los testículos de los ratones con el fin de evaluar el daño del estrés térmico sobre las células germinales del testículo y los espermatozoides presentes en el epidídimo. En diferentes momentos tras el tratamiento térmico (6 horas, 7, 14, 21, 28 días), se recogieron los espermatozoides de la cola del epidídimo y del conducto deferente y se evaluaron diferentes parámetros espermáticos. Paralelamente, se utilizó otro grupo de animales tratados para establecer cruces con hembras en los momentos señalados después del estrés térmico; adicionalmente, se evaluó el porcentaje de hembras gestantes, la tasa de implantación embrionaria y el sexo de los fetos concebidos por estos machos. Los resultados indicaron que un tratamiento térmico moderado y por un corto período de tiempo afecta de diferente manera a los distintos tipos de células germinales masculinas, produciendo un incremento de la fragmentación del ADN espermático en el período de 0 a 28 días después del estrés térmico. Cuando las células dañadas fueron espermatozoides, los animales eran subfértiles. Sin embargo, los espermatozoides formados a partir de las espermátidas afectadas mostraron los niveles más elevados de fragmentación del ADN, sin que la fertilidad de los machos se viera alterada. Cuando los afectados por el estrés térmico fueron los espermatozoides presentes en el epidídimo, observamos una distorsión de la proporción de sexos de la descendencia a favor de las hembras.

En el tercer ensayo se persiguió como objetivo conocer los mecanismos implicados en la fragmentación del ADN espermático y a la vez, establecer las consecuencias que sobre el desarrollo embrionario y la fertilidad del individuo tiene la utilización, mediante ICSI, de muestras espermáticas con un elevado grado de fragmentación del ADN. Para ello, las muestras de espermatozoides recogidas de la cola del epidídimo y del conducto deferente fueron incubadas en diferentes condiciones antes de la determinación de la fragmentación del ADN espermático. Las condiciones elegidas fueron tres: a) un medio habitualmente utilizado para la manipulación de los

embriones de ratón, medio M2; b) un medio llamado medio condicionado (MC), en el que se encuentran todos los componentes (p.ej. endonucleasas) liberados por espermatozoides a los que se les ha dañado su membrana plasmática mediante congelación-descongelación, en ausencia de crioprotectores y c) el medio MC suplementado con EDTA, quelante de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ , cofactores esenciales para la actividad de las endonucleasas. Observamos que el porcentaje de espermatozoides con ADN fragmentado es mayor en las muestras incubadas en MC respecto al valor observado en el grupo control, sin embargo, este porcentaje no es diferente al del control cuando los espermatozoides son incubados en MC suplementado con EDTA. En conclusión, existen factores presentes en los medios que contienen espermatozoides con daño en su membrana plasmática capaces de inducir fragmentación del ADN en espermatozoides tratados. Estos factores necesitan la presencia en el medio de iones, como el  $\text{Ca}^{2+}$  o el  $\text{Mg}^{2+}$ , para poder actuar. Finalmente, las muestras incubadas en MC en las que habíamos observado un incremento de la fragmentación del ADN espermático, se utilizaron para fecundar ovocitos mediante ICSI, utilizando como control espermatozoides no incubados. Tras la realización de ICSI, se observó que la incubación de los espermatozoides en MC no afectaba a la tasa de fecundación, ni al número ni a la morfología de los blastocistos; sin embargo, la tasa de implantación se vio significativamente reducida, lo que indicó un efecto negativo sobre la calidad embrionaria que se manifiesta en estadios perimplantacionales. Concluimos que los factores liberados por espermatozoides con la membrana dañada pueden, además de inducir fragmentación del ADN en los espermatozoides tratados, reducir los porcentajes de implantación de los embriones producidos con dichos espermatozoides.



## SUMMARY

The aim of the thesis was to study the influence of heat stress and sperm DNA fragmentation on embryo viability and sex ratio of the offspring.

Heat stress and sperm DNA fragmentation are two factors which exert a great influence on fertility in domestic animals. Although it is known that heat stress has a negative impact on both embryo and sperm quality, the mechanisms by which it affects preimplantation embryo development and the gender-specific responses remain unclear. Similarly, it is scarcely known that heat stress affects sperm quality and which is the impact on the embryo produced with heat stressed spermatozoa. In this perspective, sperm DNA fragmentation, one of the consequences of the heat stress, may affect sperm fertilizing ability and embryo development.

In this thesis, we firstly aim to study some of the differences between genders in mouse preimplantation embryos and their molecular basis. Secondly, the effect of heat stress on both preimplantation embryo development (*in vivo* e *in vitro*) and spermatogenesis, using the mouse as an animal model. Thirdly, to find out the conditions which increase the percentages of spermatozoa with DNA fragmentation and the consequences of using heat-stressed sperm on embryo and foetal development in natural mating or after the use of assisted reproductive techniques, such as ICSI. Three assays were designed.

In the first assay, we analyzed the effect of heat stress on *in vitro* or *in vivo* produced embryos. Firstly, we determined the sensitivity of male and female *in vitro* produced embryos to heat stress conditions and we observed that female embryos survived better than male embryos. In order to clarify the causes of the different sensitivity between genders to heat stress, we measured the relative amounts of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in compacted heat-stressed morulae which were sexed later by PCR. We observed that female heat-stressed embryos had less relative amounts of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> than males. Another difference observed between genders was the developmental speed of the embryos; *in vitro* produced female embryos grew slower than male embryos. In addition, female and male embryos displayed differential mRNA transcription of *G6pdx* and also of some genes situated on autosomal-chromosomes (*Sox*, *Bax*, and *Oct-4*).

Moreover, by inhibiting G6PD, all differences generated by oxidative stress between male and female embryos disappeared. We provide an experimental demonstration of a mechanism that explains why following exposure to heat stress-induced reactive oxygen species (ROS), female preimplantation embryos are more resistant than males.

In the second assay, we analyzed the detrimental effect of heat stress on male fertility. In an attempt to evaluate this effect on the mature and developing sperm, we used the mouse model to examine the effect of scrotal heat stress (42°C for 30 min) on spermatozoa recovered from the epididymis hours (6) or days (7, 14, 21, 28, 60) after treatment by analyzing several parameters:

number of spermatozoa, viability, motility and progressive motility of sperm, integrity of their DNA using terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labelling (TUNEL), embryo implantation rate and sex ratio of the fetuses conceived. Our results show that a transient mild scrotal affected differentially the different types of male germ cells; whereas on spermatocytes it causes subfertility, spermatozoa derived from affected spermatids showed the higher increase in DNA fragmentation without affecting fertility; and sex ratio distortion on spermatozoa already present in the epididymis.. These results evidence a higher sensibility of spermatocytes to heat exposure and suggest a different response of X and Y-bearing spermatozoa to heat stress which deserves a closer study.

The third assay was designed to study the mechanisms involved in the sperm DNA fragmentation processes and the consequences on fertility performed by ICSI using spermatozoa with a high DNA fragmentation level. We analyzed in B6D2 mice, the proportion of DNA-fragmented spermatozoa (DFS) produced by incubation in conditioned medium (CM) generated by freeze-thawing sperm in absence of cryoprotection, and the subsequent development, implantation, and offspring obtained after ICSI with incubated spermatozoa. When fresh sperm cells were incubated for 90 min in this CM, a significant increase of DFS was detected by TUNEL assay (27% vs 4.5% in fresh sperm). After ICSI of fresh and incubated spermatozoa, embryos were cultured in vitro either to 2-cell or blastocyst stage, before transferring them into pseudopregnant CD1 females. At day 14, recipients were sacrificed and implantation rates, estimated as number of live fetuses plus resorptions were determined. When ICSI was performed with sperm incubated in CM no effect on fertilization, embryo cleavage, blastocyst rate or blastocyst morphology was detected; however, quality of embryos was affected since total implantation rate decreased significantly ( $P<0.05$ ) when 2-cells or blastocysts were transferred. Independently of sperm pre-treatment, in vitro culture affected significantly the percentage of live fetuses present on Day 14 of pregnancy. These results demonstrate that there are factors released from fragmented spermatozoa capable of inducing DNA fragmentation in intact sperm cells that may compromise to some extent birth rate after ICSI.

## INTRODUCCIÓN





Los recientes avances en la manipulación de gametos y embriones han permitido ampliar el conocimiento sobre los mecanismos básicos que tienen lugar en la reproducción de los mamíferos y en las aplicaciones que se puedan desarrollar en el ámbito de la biotecnología reproductiva. Todavía existe un gran desconocimiento al respecto de la importancia que tiene la contribución del genoma paterno en el desarrollo embrionario, de los mecanismos que controlan los primeros estadios del mismo, así como de los factores que pueden influir en él. Numerosos estudios han señalado que las anomalías observadas durante el desarrollo fetal y del individuo pueden ser debidas, entre otras causas, a alteraciones observadas en los ovocitos, espermatozoides y/o a las condiciones a las que se ven sometidos los embriones durante el desarrollo preimplantacional (Tarin *et al.* 1998; Walker *et al.* 2000; McEvoy *et al.* 2003; Fleming *et al.* 2004; Fernandez-Gonzalez *et al.* 2004; Fernandez-Gonzalez R, 2005; Fernandez-Gonzalez *et al.* 2007; Ozmen *et al.* 2007). La creciente utilización de técnicas de reproducción asistida (TRA) hace imprescindible la realización de una correcta manipulación de los gametos y de los embriones en estadio preimplantacional.

En el caso de la manipulación embrionaria preimplantacional, se ha observado que el cultivo *in vitro* de embriones bovinos y su posterior transferencia, puede dar lugar al nacimiento de terneros de gran tamaño, fenómeno conocido como “síndrome del ternero gigante” (Young *et al.* 1998). En otras especies, como en ratón, se ha comprobado que condiciones subóptimas de cultivo *in vitro*, particularmente la utilización de suero en el medio de cultivo, puede tener consecuencias graves en el desarrollo postnatal y en la salud de los individuos adultos (Fernandez-Gonzalez *et al.* 2004; Fernandez-Gonzalez *et al.* 2007; Mahsoudi *et al.* 2007). Por otra parte, se debe tener en cuenta que las alteraciones en el desarrollo preimplantacional no están limitadas al cultivo *in vitro*, sino que pueden ser consecuencia de situaciones estresantes experimentadas *in vivo*, como la descrita por Kwong *et al.* (2000). Estos investigadores observaron en ratas un efecto de la dieta materna sobre el desarrollo embrionario y la proporción de sexos de la descendencia (Kwong *et al.* 2000). Éstos son sólo algunos de los ejemplos que demuestran que el ambiente al que es sometido el embrión durante el periodo preimplantacional es crítico para un correcto desarrollo futuro.

Los factores ambientales juegan un papel fundamental en el éxito reproductivo de los animales y del ser humano. Entre los efectos que el calor produce a nivel celular y molecular, hay que destacar que el estrés térmico incrementa la producción de radicales libres de oxígeno (RLO) (Ikeda *et al.* 1999). Cuando este aumento supera la cantidad de RLO que el organismo es capaz de eliminar mediante los mecanismos de protección que dispone para tal efecto, se produce una situación de estrés oxidativo. En esta situación, el exceso de RLO provoca modificaciones en lípidos, proteínas y ADN (Wells *et al.* 1997).

Los procesos reproductivos en mamíferos son muy sensibles a la hipertermia en ambos sexos. Como principal consecuencia destaca la reducción en la cantidad y calidad de los

espermatozoides y la disminución de la fertilidad de las hembras (Woody and Ulberg, 1964; Narendranath and Kiracofe, 1975; Wildt *et al.* 1975; Sailer *et al.* 1997; Jannes *et al.* 1998; Ozawa *et al.* 2002; Banks *et al.* 2005; Yaeram *et al.* 2006). Por tanto en épocas de intenso calor, se observa una menor fertilidad de los machos así como una reducción en las tasas de gestación en las hembras, en numerosas especies animales. Cuando las hembras en los primeros días de gestación son sometidas a condiciones ambientales de estrés térmico, se produce un aumento de la mortalidad embrionaria. Este fenómeno es debido a que los embriones, en estadios preimplantacionales, son sensibles al aumento de la temperatura y a los cambios que tienen lugar en el tracto genital femenino por el estrés térmico (Edwards *et al.* 2001; Guerin *et al.* 2001; Ozawa *et al.* 2002; Sartori *et al.* 2002; Ozawa *et al.* 2004). Igualmente, se observa un aumento de la mortalidad embrionaria cuando los embriones cultivados *in vitro* son sometidos a condiciones de estrés térmico (Ryan *et al.* 1992; Ozawa *et al.* 2002; Rivera *et al.* 2003;). Algunos de estos estudios sugieren que la vulnerabilidad al estrés térmico podría ser diferente entre embriones de sexo masculino y femenino, siendo los embriones de sexo masculino más vulnerables que los de sexo femenino (James, 1998a).

Durante el desarrollo embrionario preimplantacional se suceden diferentes mecanismos (reprogramación génica, epigenética, diferencias metabólicas, etc) que van a intervenir en la relación existente entre ambiente y desarrollo del propio embrión (Fleming *et al.* 2004). Estos mecanismos han de tenerse en cuenta a la hora de analizar el efecto del estrés térmico sobre el desarrollo embrionario preimplantacional, tanto *in vivo* como *in vitro*. Además, durante este periodo preimplantacional, se han observado diferencias entre embriones de distinto sexo en la expresión de genes ligados al cromosoma X (Gutierrez-Adan *et al.* 2000; Jimenez *et al.* 2003b; Wrenzycki *et al.* 2002), así como en la expresión de algunos genes autosómicos (Larson *et al.*, 2001). Concretamente, en embriones bovinos, se ha observado que la expresión de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (*G6PD*), un gen ligado al cromosoma X (Chapman *et al.* 1976) y relacionado con el estrés oxidativo, es mayor en los embriones de sexo femenino que en los de sexo masculino (Gutierrez-Adan *et al.* 2000; Jimenez *et al.* 2003b; Wrenzycki *et al.* 2002). Como consecuencia de estas diferencias, los embriones se pueden ver afectados de distinta manera por condiciones ambientales extremas en función de su sexo. En esta línea, se han publicado diversos trabajos en los que se demuestra que los embriones de distinto sexo tienen diferente capacidad de respuesta cuando son sometidos a determinadas condiciones ambientales (Bermejo-Alvarez *et al.* 2008; Cameron *et al.* 2008; Gutierrez-Adan, 2005; Gutierrez-Adan *et al.* 2001a; Gutierrez-Adan *et al.* 2006a; Jimenez *et al.* 2003b; Kochhar *et al.* 2001) También se han descrito alteraciones en la velocidad de desarrollo, en la tasa de mortalidad embrionaria e, incluso, en la susceptibilidad a desarrollar anomalías asociadas al sexo del individuo en el animal adulto (Bernardi and Delouis, 1996; Gutierrez-Adan *et al.* 1996; Gutierrez-Adan *et al.* 2001b; Gutierrez-Adan *et al.* 2006b; Gutierrez-Adan *et al.* 1999; Jimenez *et al.* 2003a; Jimenez *et al.* 2003b; Valdivia *et al.* 1993). El conocimiento del dimorfismo sexual de los embriones en estadio preimplantacional puede ser una herramienta muy útil para seleccionar el sexo de la descendencia y para entender aspectos claves

del desarrollo preimplantacional como son la inactivación del cromosoma X o los procesos genéticos y epigenéticos que se producen en el embrión y que pueden tener un efecto a corto y largo plazo.

Se entiende por proporción de sexos de la descendencia, en inglés “sex ratio”, la relación entre proporción de machos y hembras. Se considera que existe una alteración de la proporción de sexos en la descendencia cuando existe una diferencia significativa respecto a la proporción esperada (1:1). El conocimiento de los factores que influyen en ella es de gran interés desde un punto de vista productivo, ya que, tanto en las ganaderías de leche como en las de carne, el sexo de la progenie condiciona su productividad (Ruvuna *et al.* 1992). Se ha observado que las condiciones maternas, ambientales y otras circunstancias estresantes pueden afectar a la proporción de sexos en la descendencia de los mamíferos. Entre las causas descritas se encuentran la estación del año, las condiciones climáticas, el estrés, el agotamiento sexual, la nutrición, las condiciones reproductivas, etc. (James, 1998d). Concretamente, diversos contaminantes ambientales y factores estresantes han sido relacionados con un descenso de la proporción de individuos de sexo masculino en la descendencia de los seres humanos y de los animales (James, 1998a); entre ellos se encuentra el estrés térmico (Roche *et al.* 2006).

Son numerosos los estudios que establecen que el estrés térmico, tanto ambiental como aplicado localmente sobre el escroto de los animales, tiene un impacto negativo sobre la calidad espermática (Banks *et al.* 2005; Lue *et al.* 2000; Mieusset *et al.* 1987; Mieusset *et al.* 1992b; Skinner and Louw, 1966). Cuando el estrés térmico se aplica localmente sobre el escroto de los machos (estrés térmico escrotal) se producen alteraciones en la espermatogénesis que afectan al número, viabilidad, motilidad e integridad del ADN de los espermatozoides producidos y, como consecuencia, la fertilidad de los machos disminuye (Banks *et al.* 2005; Love and Kenney, 1999). Algunos autores han demostrado que tras someter a los machos a ciertas condiciones estresantes que producen una alteración de la calidad espermática, se observa en su descendencia una alteración en la proporción de sexos (Viloria *et al.* 2005). Otros autores han sugerido que en ciertas especies, como por ejemplo en ciervos (*Cervus elaphus*), existe relación entre la calidad espermática, la fertilidad del macho y la proporción de sexos de su descendencia (Gomendio *et al.* 2006). Estas observaciones sugieren que es interesante investigar si el estrés térmico escrotal puede afectar de forma diferencial a los espermatozoides portadores del cromosoma X e Y y provocar una distorsión en la proporción de sexos de la descendencia.

La calidad espermática y la embrionaria están íntimamente relacionadas. En este sentido, nuestro interés se centró en un aspecto de creciente importancia en reproducción animal como es la integridad del ADN de los espermatozoides. La integridad del genoma paterno es esencial para una correcta transmisión de la información genética entre generaciones y su estudio es esencial para tener un mejor conocimiento sobre la contribución paterna al desarrollo embrionario. Una incorrecta integridad del ADN espermático puede tener consecuencias negativas sobre el

desarrollo embrionario y fetal de los individuos (Aitken and Baker, 2004; Borini *et al.* 2006; Fatehi *et al.* 2006; Saleh *et al.* 2003; Sun *et al.* 1997; Tesarik *et al.* 2004). Algunos autores han indicado que los espermatozoides con daño nuclear mantienen su habilidad para fecundar los ovocitos en metafase II (Ahmadi and Ng, 1999b); sin embargo, la presencia en el embrión de ciertas modificaciones a nivel de nucleótidos procedentes del complemento genómico paterno que no hayan sido reparadas por el ovocito, pueden ser incompatibles con el desarrollo embrionario y fetal normal (Aitken and Baker, 2006). El creciente interés en estudiar la integridad del ADN de los espermatozoides, en el ámbito de las TRA, se debe a que recientes investigaciones han relacionado los elevados índices de fragmentación del ADN de los espermatozoides utilizados en estas técnicas con un aumento del número de casos de enfermedades genéticas y cáncer (Aitken, 1999; Aitken *et al.* 2003; Ji *et al.* 1997). Entre las TRA, destaca la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI); con la utilización de esta técnica se sobrepasan las barreras fisiológicas que un espermatozoide debe superar para fecundar el ovocito incrementándose las posibilidades de fecundación. En este sentido, se deben valorar especialmente aquellas muestras que presentan un porcentaje de espermatozoides con daño nuclear significativamente superior al encontrado en individuos fértiles cuando se recurre a la realización de la técnica de ICSI (Enciso *et al.* 2006; Ozmen *et al.* 2007; Saleh *et al.* 2003; Sergerie *et al.* 2005; Zini and Libman, 2006). Basándose en los resultados de estos estudios, los investigadores recomiendan analizar la integridad de la cromatina de los espermatozoides antes de ser utilizados en las técnicas de reproducción asistida (Ozmen *et al.* 2007). Los análisis seminales rutinarios que se centran en la determinación de la concentración, motilidad y morfología espermática, no son capaces de detectar daños sutiles en la estructura de la cromatina espermática (Ballachey *et al.* 1988). Por ello, el análisis de la integridad de la cromatina de los espermatozoides puede ayudar a seleccionar los espermatozoides intactos o con un bajo nivel de daño nuclear, siendo de gran valor pronóstico en la tasa de éxito de las técnicas de reproducción asistida (Boe-Hansen *et al.* 2006; Bungum *et al.* 2004; Seli and Sakkas, 2005; Spano *et al.* 2005; Zini and Libman, 2006).

Por otra parte, la evaluación de la integridad de la cromatina espermática, en combinación con la determinación de la motilidad y viabilidad espermáticas puede ayudar en la valoración más precisa de la calidad de las muestras seminales en los animales domésticos (Rodríguez-Martínez, 2007). A su vez, la calidad seminal está directamente relacionada con la capacidad fecundante de los espermatozoides y, por tanto, con el éxito reproductivo (Rodríguez-Martínez and Barth, 2007). La evaluación de la integridad de la cromatina espermática es una herramienta muy importante para predecir el éxito de la inseminación artificial, la técnica de reproducción asistida usada más frecuentemente en las especies de animales domésticos (García-Macias *et al.* 2007; López-Fernández *et al.* 2007). También permite valorar si el proceso de congelación de los espermatozoides es el adecuado para mantener la integridad del genoma espermático, condición indispensable para un correcto establecimiento de los bancos de germoplasma de diferentes especies (Boe-Hansen *et al.* 2005; Fraser and Strzezek, 2005; Fraser and Strzezek, 2006; Hernández *et al.* 2006; Martín *et al.* 2004; Peris *et al.* 2007; Yildiz *et al.* 2007).

Considerando todo lo anterior, en esta tesis se ha analizado el efecto del estrés térmico, aplicado tanto *in vivo* como *in vitro*, en el desarrollo embrionario preimplantacional (capítulo I) y el efecto del estrés térmico escrotal como agente externo que produce una alteración de la calidad espermática (capítulo II). En ambos casos, la viabilidad de los embriones puede verse comprometida. Además, se ha examinado si los efectos nocivos del estrés térmico pueden afectar de forma diferente a embriones de distinto sexo. Estos resultados pretenden aportar nuevos datos sobre los mecanismos que provocan que exista una distorsión en la proporción de sexos, así como ayudar a conocer mejor algunos de los procesos que tienen lugar durante el desarrollo embrionario preimplantacional y que son en parte responsables del diferente comportamiento que los embriones de distinto sexo manifiestan ante las situaciones estresantes. El daño que pueden presentar los espermatozoides que se van a utilizar en las técnicas de reproducción asistida (TRA) puede haberse originado durante el proceso de espermatogénesis, durante el tránsito a través del epidídimo o durante el procesamiento de las muestras espermáticas en el laboratorio. Por esa razón, se eligió el estrés térmico escrotal, potencial contribuidor a la fragmentación del ADN de los espermatozoides, como situación desestabilizante del proceso de espermatogénesis, evaluándose, de este modo, las consecuencias sobre los espermatozoides producidos en diferentes momentos tras aplicar dicho estrés. Además, se analizó cómo se veía afectado el desarrollo de los fetos concebidos tras la monta natural de los machos sometidos al estrés térmico. Finalmente, en el capítulo III, con el objetivo de profundizar en el conocimiento de los mecanismos implicados en la fragmentación del ADN espermático, nos planteamos determinar si el procesamiento inadecuado de las muestras espermáticas en el laboratorio puede provocar alteraciones en el ADN de los espermatozoides. A su vez, mediante el empleo de la técnica de ICSI, quisimos establecer cuáles pueden ser las consecuencias sobre el desarrollo embrionario y la fertilidad de la utilización de muestras espermáticas con un elevado grado de fragmentación del ADN.

Para llevar a cabo estos objetivos, el modelo sobre el que se realizaron los experimentos de esta tesis es el ratón (*Mus musculus*). Se trata de un modelo animal muy recomendable por varias razones, entre las que destacan su pequeño tamaño, su fácil manejo, su corto periodo generacional, su fácil mantenimiento y su gran rendimiento reproductivo a lo largo de todo el año. Los embriones de ratón en estadio preimplantacional han sido y son esenciales para mejorar nuestros conocimientos sobre biología embrionaria y, en concreto, para el análisis de la regulación de la expresión génica durante la embriogénesis en los mamíferos. A su vez, las investigaciones realizadas con embriones juegan un papel fundamental en el desarrollo y perfeccionamiento de las técnicas de reproducción asistida.



## **OBJETIVOS**





1. Determinar mecanismos causantes de las diferencias fisiológicas que existen entre embriones de distinto sexo en el periodo preimplantacional.
2. Evaluar la respuesta de los embriones murinos de distinto sexo en estadio preimplantacional frente al estrés térmico *in vivo* e *in vitro*.
3. Analizar el efecto del estrés térmico escrotal en los espermatozoides producidos en diferentes momentos después del estrés térmico y las consecuencias sobre la descendencia de los animales tratados:
  - 3.1. Clasificar las células de la línea germinal masculina en función de su susceptibilidad al estrés térmico mediante la caracterización y correlación de diversos parámetros espermáticos, entre ellos, la integridad del ADN espermático.
  - 3.2. Examinar las consecuencias del estrés térmico paterno sobre el desarrollo embrionario y fetal.
  - 3.3. Determinar si el estrés térmico paterno puede influir en la proporción de sexos de la descendencia.
4. Evaluar si los factores liberados por espermatozoides que presentan daño en su membrana plasmática intervienen en el proceso de degradación del ADN espermático.
5. Determinar las consecuencias que tiene sobre el desarrollo embrionario la utilización de inyección intracitoplasmática de espermatozoides con un elevado grado de fragmentación del ADN.



## **REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**



### **3.1. Fecundación y desarrollo embrionario preimplantacional en el ratón**

#### 3.1.1. Inactivación del cromosoma X

### **3.2. Dimorfismo sexual de los embriones durante el desarrollo preimplantacional**

#### 3.2.1. Diferencias en la tasa de crecimiento y en la expresión génica entre embriones de sexo masculino y femenino en estadios preimplantacionales

#### 3.2.2. Diferencias epigenéticas entre embriones de distinto sexo

### **3.3. Control de la proporción de sexos en mamíferos**

#### 3.3.1. Teorías de los mecanismos que influyen en la proporción de sexos

#### 3.3.2. Factores que afectan a la proporción de sexos

### **3.4. Efecto del estrés térmico sobre el desarrollo embrionario preimplantacional**

#### 3.4.1. Efecto del estrés térmico materno sobre el desarrollo embrionario

#### 3.4.2. Efecto del estrés térmico *in vitro* sobre el desarrollo embrionario

### **3.5. Consecuencias del estrés térmico escrotal en la espermatogénesis y en el desarrollo embrionario**

#### 3.5.1. Circunstancias que provocan el estrés térmico escrotal

#### 3.5.2. Espermatogénesis en el ratón

#### 3.5.3. Alteraciones en el proceso de espermatogénesis a causa del estrés térmico

#### 3.5.4. Consecuencias del estrés térmico paterno sobre el futuro desarrollo embrionario

### **3.6. Importancia del daño nuclear espermático en la fecundación y en el desarrollo embrionario y fetal**

#### 3.6.1. Estructura de la cromatina espermática

#### 3.6.2. Factores implicados en el daño nuclear espermático

#### 3.6.3. Metodologías para la detección del daño nuclear de los espermatozoides

#### 3.6.4. Efecto del daño nuclear espermático en la fertilidad y en el desarrollo embrionario

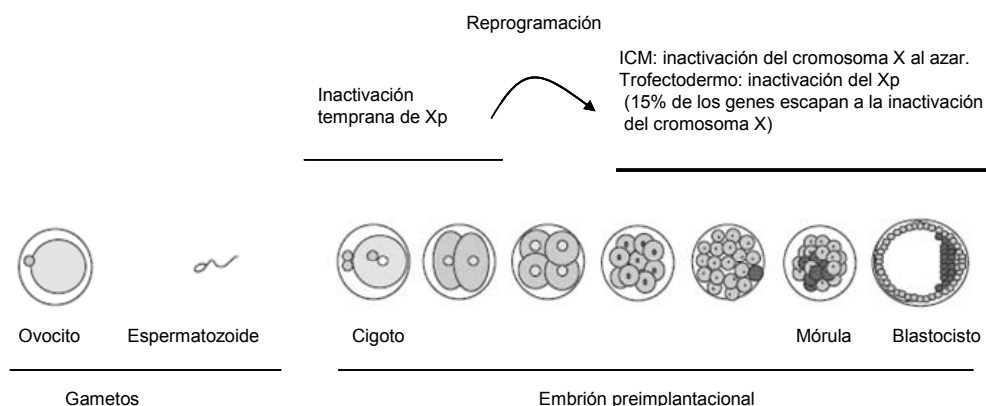
### 3.1. Fecundación y desarrollo embrionario preimplantacional en el ratón

Se conoce como desarrollo preimplantacional de los embriones, al periodo comprendido desde el estadio de cigoto (ovocito fecundado por el espermatozoide) hasta el estadio de blastocisto expandido. Es un periodo en el que tienen lugar procesos de vital importancia para el desarrollo, como son la formación del cigoto, la primera división mitótica, la activación del genoma embrionario, la compactación de las mórulas (embriones compactados con más de 16 blastómeras) y la formación del blastocisto. El desarrollo embrionario inmediatamente después de la fecundación depende del ARNm materno y las proteínas almacenadas en los ovocitos maduros (Schultz, 2005). La activación del genoma embrionario es un proceso esencial que se inicia en estadios tan tempranos como el estadio de cigoto en el caso del ratón y que se incrementa gradualmente según el desarrollo embrionario progresa (Latham and Schultz, 2001). El número de genes expresados en el estadio de blastocisto es limitado comparado con los más de 25.000 expresados en el adulto. Sin embargo, se espera que los genes que se expresan durante el estadio de blastocisto tengan un papel fundamental en la implantación y el posterior desarrollo del feto (revisado en Fleming *et al.* 2004).

#### 3.1.1. Inactivación del cromosoma X

La inactivación del cromosoma X es una modificación epigenética que ocurre en los embriones de sexo femenino. Tres publicaciones recientes demuestran que en los embriones de ratón de sexo femenino, el cromosoma X de origen paternal (Xp) es transcripcionalmente activo en los estadios de dos y cuatro células y es silenciado progresivamente mediante mecanismos de impronta genómica que tienen lugar en el desarrollo embrionario preimplantacional (Mak *et al.* 2004; Okamoto *et al.* 2004). Posteriormente, los dos cromosomas X se reprograman, se produce la reactivación del Xp y tienen lugar dos formas de inactivación del cromosoma X, al azar y preferencial. La inactivación al azar ocurre entorno al momento de la implantación en las células procedentes de la masa celular interna (ICM) que darán lugar al embrión; en algunas de estas células será el cromosoma X de origen materno (Xm) el que se inactive y en otras células, la inactivación se producirá en el Xp. La inactivación preferencial es exclusiva del Xp y se produce únicamente en las células que darán lugar a los tejidos extraembrionarios (Fig.1.1). Se ha publicado que alrededor de un 15% de los genes presentes en el cromosoma X escapan de la inactivación y, por lo tanto, pueden ser expresados en un nivel hasta dos veces superior en las hembras que en los machos (Carrel and Willard, 2005; Kobayashi *et al.* 2006; Tsuchiya and Willard, 2000) concretamente, en el caso del ratón, se ha observado que algunos genes esenciales para el desarrollo son capaces de escapar de este mecanismo de inactivación de la cromatina (Gutierrez-Adan *et al.* 2000; Jimenez *et al.* 2003b; Kobayashi *et al.* 2006). Algunos genes en el cromosoma X se transcriben a partir del cromosoma X activo y del inactivo en niveles similares, mientras que otros se transcriben a partir del cromosoma X inactivado en niveles más reducidos, pero todavía significativos (Kobayashi *et al.* 2006). Independientemente del grado en el

que los genes escapan de la inactivación del cromosoma X, es probable que en las células XX se produzca una mayor expresión de algunos de estos genes, comparando con la expresión génica en las células XY.



**Fig 3.1.** Representación esquemática de la inactivación del cromosoma X en embriones de sexo femenino. En la ICM del embrión se cree que la inactivación del cromosoma X se produce al azar, *a priori* tanto el cromosoma X paternal o maternal tienen la misma probabilidad de estar activos o inactivos (Modificado de Mak *et al.* 2004).

### 3.2. Dimorfismo sexual de los embriones durante los estadios del desarrollo preimplantacional

En los mamíferos de la subclase Eutheria, numerosos trabajos han demostrado claramente que existen diferencias entre los embriones de sexo masculino y femenino que aparecen antes de la diferenciación sexual de las gónadas y que, por lo tanto, no pueden ser explicadas por las diferencias en los niveles hormonales existentes entre sexos (Burgoyne *et al.* 1995; Mittwoch, 1993).

#### 3.2.1. Diferencias en la tasa de crecimiento y en la expresión génica entre embriones de sexo masculino y femenino en estadios preimplantacionales

En todas las especies de mamíferos en las que se ha investigado, los embriones preimplantacionales de sexo masculino producidos *in vitro* se desarrollan más rápidamente que los embriones de sexo femenino; como ejemplos podemos citar el modelo murino (Zwingman *et al.* 1993), bovinos (Avery *et al.* 1992), humanos (Pergament *et al.* 1994), porcinos (Cassar *et al.* 1994) y ovinos (Bernardi and Delouis, 1996). Además, utilizando análisis de micromatrices de ADN, un estudio reciente ha mostrado que hay más de 600 genes que se expresan de manera diferencial entre embriones de ratón de distinto sexo cuando los embriones son cultivados *in vitro* desde el



estadio de cuatro células hasta el estadio de blastocisto (Kobayashi *et al.* 2006); sin embargo, se desconoce si estas diferencias también se observan en embriones producidos *in vivo*. La mayoría de estos genes están localizados en el cromosoma X y están sobreexpresados en los embriones de sexo femenino (Kobayashi *et al.* 2006).

Los factores genéticos que pueden afectar de manera diferencial los procesos bioquímicos básicos de los embriones preimplantacionales de sexo masculino o femenino pueden ser específicos de los machos o específicos de las hembras. Existen dos factores específicos de los machos: la expresión de genes específicos del cromosoma Y (Erikson *et al.* 1997; Gutierrez-Adan *et al.* 1997) y las mutaciones recesivas ligadas al cromosoma X. Existen también dos factores específicos de las hembras, la expresión de algunos genes por parte de ambos cromosomas X y el error en el inicio o el mantenimiento de la inactivación del cromosoma X.

Las diferencias observadas en las tasas de crecimiento entre embriones de distinto sexo reflejan diferencias en su actividad metabólica (Kochhar *et al.* 2001). En trabajos anteriores, se ha mostrado que los niveles de transcripción de ARNm de tres genes ligados al cromosoma X son mayores en los embriones bovinos de sexo femenino que en los de sexo masculino en estadio temprano de blastocisto (Gutierrez-Adan *et al.* 2000; Jimenez *et al.* 2003b; Wrenzycki *et al.* 2002). Dos de estos genes son integrantes fundamentales del metabolismo energético y están también relacionados con el control de la cantidad de radicales libres de oxígeno (RLO), son la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (*G6PD*) y la hipoxantina fosforribosil transferasa (*HPRT*); el tercero, es el inhibidor de apoptosis unido al X (*XIAP*), se trata de un gen que codifica una proteína de los mamíferos que controla la apoptosis mediante la modulación de la actividad de las caspasas. Esta expresión génica diferencial ha sido también confirmada en otras especies (Taylor *et al.* 2003; Wrenzycki *et al.* 2002).

*G6PD* es la enzima que regula el primer paso limitante de la ruta de las pentosas fosfato (PPP) (Wood *et al.* 1985) y es importante por su papel en la regeneración de nicotiamida-adenina dinucleotido fosfato (NADPH). En situaciones de estrés oxidativo celular, NADPH es crítico para mantener el glutatión en su forma reducida (GSH), que es, a su vez, esencial para la detoxificación de radicales libres y lípidos hidroperoxidados (Nicol *et al.* 2000). Además se ha comprobado que la actividad de la enzima *G6PD* está muy relacionada con la capacidad de desarrollarse que tienen los embriones; bajo condiciones de estrés de una alta tensión de oxígeno, los embriones con una alta actividad de *G6PD* se desarrollan mejor que aquellos con una actividad baja de la enzima (Iwata, 2002).

### **3.2.2. Diferencias epigenéticas entre embriones de distinto sexo**

Antes del comienzo de la diferenciación de las gónadas, tienen lugar modificaciones epigenéticas. Algunas de las diferencias epigenéticas entre embriones de distinto sexo han sido revisadas por Gutierrez-Adan *et al.* (2006). Recientemente, se ha puesto de manifiesto la existencia de algunas diferencias epigenéticas entre embriones bovinos de distinto sexo cultivados *in vitro* (Bermejo-Alvarez *et al.* 2008). Estas diferencias no afectan a todo el genoma sino que

afectan a secuencias o regiones genómicas específicas y se relacionan con diferencias en los niveles de expresión de genes reguladores del status epigenético (*Dnmt3a*, *Dnmt3b*, *Hmt1* e *Ilf3*). Los autores de este trabajo proponen que estas diferencias epigenéticas pueden modular las diferencias observadas entre embriones de distinto sexo respecto a tasa metabólica, velocidad de desarrollo y expresión génica.

### **3.3. Control de la proporción de sexos en mamíferos**

Uno de los objetivos largamente perseguidos por la comunidad científica es la obtención de descendientes de un determinado sexo, debido a su extrema importancia en producción animal. La producción ganadera bovina es un claro exponente de ello. En el caso de ganado de carne y en los centros de producción de animales para esquemas de selección se prefiere una descendencia masculina, mientras que en animales destinados para producción láctea, se persigue tener una progenie femenina. Existen dos sistemas para manipular la proporción del sexo, la determinación del sexo en biopsias embrionarias, o bien la separación de espermatozoides portadores de cromosoma X o el Y. La única diferencia evidente entre espermatozoides portadores del cromosoma X e Y es el contenido en DNA (el cromosoma X representa el 5% del contenido haploide del DNA, mientras que el cromosoma Y solo representa el 1- 2 %).

Una vía para manipular la proporción de sexos la determina la propia naturaleza del carácter “sex-ratio” o proporción de sexos. Se define como “sex-ratio” la relación entre proporción de machos y hembras, se expresa como el número de machos por cada 100 individuos de la población. Se sugiere que el “sex-ratio” puede estar determinado, entre otros factores, por la edad de la madre, la alimentación, la densidad de población, el momento de la cubrición en relación al de ovulación, la estación del año en la que se produce la cubrición, etc. Hay tres tipos de “sex-ratio”, el primario que expresa la proporción de sexos en el momento de la fecundación, el secundario que define la proporción de sexos en el momento del nacimiento, y el terciario que define la proporción de sexos cuando se alcanza la fase reproductiva. En teoría, en mamíferos, puesto que los testículos producen la misma cantidad de espermatozoides portadores del cromosoma X e Y, debería producirse el mismo número de machos y hembras. Utilizando citometría de flujo se ha demostrado, en humanos y en todas las especies de mamíferos en las que se ha analizado el eyaculado, que la proporción de espermatozoides portadores del cromosoma X e Y en un eyaculado es la misma (Gutierrez-Adan, 2005); sin embargo, se ha observado una variación en el “sex-ratio” en muchas de las especies de mamíferos analizadas, por ejemplo, en humanos, el “sex ratio” secundario es elevado (106 varones por 100 mujeres en humanos) (Pergament *et al.* 2002).

#### **3.3.1. Teorías de los mecanismos que influyen en la proporción de sexos**

En mamíferos, donde existe dimorfismo sexual y los machos son de mayor tamaño que las hembras, los hijos suponen un coste mayor para las hembras que las hijas; sin embargo, los hijos

tienen una mayor vida reproductiva y en general pueden tener más descendientes que las hembras, y por lo tanto transmiten sus genes a más descendientes que las hembras. En consecuencia, la teoría de la proporción de sexo predice que la selección natural favorecerá el exceso de machos cuando las condiciones maternas sean buenas (Trivers and Willard, 1973). Los animales en cautividad mantenidos en los zoológicos son un ejemplo perfecto de la alteración en la proporción de sexos; estos animales están en unas condiciones muy distintas a las que se encuentran en estado salvaje en la naturaleza, lo cual produce una alteración de la proporción de sexos de la descendencia, siendo el porcentaje de hembras nacidas mayor al esperado.

Son muchos los factores y los mecanismos que han sido descritos como causantes de la distorsión de la proporción de sexos observados; en la mayoría de los casos esta distorsión en la proporción de sexos es multifactorial, no pudiendo concretarse que un sólo mecanismo sea el único causante. De forma teórica se agrupan los mecanismos causantes de la distorsión en la proporción de sexos según tengan éstos lugar antes o después del momento de la fecundación; se dividen en mecanismos pre-concepcionales y mecanismos post-concepcionales. Recientemente se ha puesto en evidencia la existencia de ambos mecanismos en la determinación de la proporción de sexos de la descendencia en el ratón (Jimenez *et al.* 2003a).

#### **3.3.1.1. Mecanismos pre-concepcionales**

Existen dos teorías principales sobre la manipulación del carácter “sex-ratio” en los momentos anteriores a la fecundación; la teoría hormonal y la teoría de las diferencias espermáticas entre espermatozoides portadores de un cromosoma X o Y. Diferencias en niveles hormonales en la hembra durante el ciclo estral pueden modular mecanismos de selección de los espermatozoides portadores del cromosoma X o Y, afectando a su tránsito por el útero y oviducto, de tal forma que la fecundación en el momento de la ovulación produciría un mayor número de hembras y la fecundación antes o después de la ovulación produciría un mayor número de machos (James, 1997b). Se ha sugerido que el nivel de testosterona en el fluido folicular bovino puede predisponer al ovocito a ser fecundado preferencialmente por los espermatozoides portadores del cromosoma X o del cromosoma Y (Grant and Irwin, 2005). En un trabajo reciente, estos mismos autores han descrito que existe una correlación positiva entre el nivel de testosterona en el fluido folicular y la probabilidad de que el ovocito recogido de dicho folículo sea fecundado *in vitro* por un espermatozoide portador del cromosoma Y (Grant *et al.* 2008). Alternativamente, los niveles hormonales masculinos en el momento de la fecundación son también considerados por esta hipótesis (James, 1986; James, 1987; James, 1989; James, 1992; James, 2004; James, 2007). Aunque no hay evidencia experimental para esta hipótesis, se sabe que varios factores que afectan a los niveles endocrinos, también afectan la proporción de sexos, como por ejemplo factores toxicológicos, cancerígenos, dermatológicos, deportivos, ginecológicos, oncológicos, etc (James, 1996; James, 1997a; James, 1998b; James, 1998c).

En relación a las diferencias espermáticas (entre espermatozoides portadores del cromosoma X e Y) y debido a su efecto sobre el “sex-ratio” primario, Chandler *et al.* (1998)

comprobaron que distintos eyaculados de un mismo toro pueden producir una desviación de la proporción de sexos de la descendencia. Este hecho se basa en que la espermatogénesis es continua, por lo que, dependiendo del tiempo de reposo de los animales antes de la recogida del eyaculado, habrá diferencias en la edad de los espermatozoides. Este envejecimiento puede afectar diferencialmente a espermatozoides portadores del cromosoma X o Y. Igualmente, Kochlar et al. (2001) han publicado que el envejecimiento espermático distorsiona la proporción de sexos.

### **3.3.1.2. Mecanismos post-concepcionales**

Se han publicado múltiples casos en donde se observan diferencias en la proporción de sexos en animales de laboratorio, de granja, de zoológicos, salvajes y en humanos (Krackow, 1995b). Existe una variedad de factores ambientales, fisiológicos y sociológicos que influyen en la proporción de sexos en los mamíferos. Sin embargo, ninguno de estos factores ha demostrado un efecto que permitiera ser utilizado para predecir experimentalmente el sexo. Recientemente se ha propuesto un mecanismo potencial que relaciona factores ambientales y fisiológicos. En este mecanismo se asume que los factores externos pueden afectar o bien a la dinámica de apareamientos o bien al desarrollo uterino. Ambos efectos pueden alterar la sincronía entre el útero y los blastocistos (momento en que los embriones están preparados para implantarse). A este respecto, se asume que los embriones que se encuentran en un estadio más avanzado o más retrasado del desarrollo son los que tienen una menor tasa de implantación, y los embriones con un desarrollo sincronizado con el útero son los que más probabilidad tienen de implantarse. Esta teoría se denomina “teoría de la sincronía en el desarrollo” (Krackow, 1995a). En relación a esta teoría, recientemente se ha publicado que los embriones preimplantacionales de sexo masculino se desarrollan más rápido que los de sexo femenino (Gutierrez-Adan et al. 1996; Gutierrez-Adan et al. 1999; Pergament et al. 1994). De esta forma si la sincronía uterina favorece que se desarrollen los embriones de desarrollo rápido, predominarán los machos en la descendencia, y predominarán hembras cuando la sincronía uterina favorezca a los embriones de desarrollo lento.

Se ha observado que el sexo de los terneros que se obtienen de transferencias de embriones bovinos, producidos en ciertas condiciones de producción *in vitro* (PIV), es predominantemente masculino (Van Langendonck et al. 1996). Además, se ha observado que en algunas condiciones de PIV, los embriones bovinos de sexo masculino no sólo se desarrollan hasta el estadio de blastocisto más rápidamente que los embriones de sexo femenino, sino que un mayor número de embriones de sexo masculino consiguen desarrollarse hasta blastocisto expandido dando lugar a una mayor proporción de toros en la descendencia (Gutierrez-Adan et al. 1996; Gutierrez-Adan et al. 1999). Todas estas diferencias entre géneros se producen antes de la diferenciación sexual de las gónadas, por lo que ésta no puede ser su causa. Una hipótesis interesante es que estas diferencias de desarrollo pueden ser debidas a la expresión de algunos genes bien presentes en el cromosoma X o bien en el Y. Las diferencias en la velocidad de crecimiento entre cigotos XX y XY que se produce inmediatamente después de la fecundación, sugiere que algún gen ligado al cromosoma Y podrían expresarse en fases muy tempranas de

desarrollo (Pergament *et al.* 1994; Zwingman *et al.* 1993). Un gen que podría contribuir al efecto del cromosoma Y es su región determinante del sexo (*Sry*), sin embargo se conoce muy poco sobre la actividad transcripcional de este gen. También la expresión de genes del cromosoma X puede ser una de las causas de las diferencias observadas entre embriones de sexo masculino y femenino (Gutierrez-Adan *et al.* 2000; Jimenez *et al.* 2003b; Kobayashi *et al.* 2006; Taylor *et al.* 2003; Wrenzycki *et al.* 2002). James (1998) propone que la inducción de estrés oxidativo y la apoptosis en los estadios embrionarios del desarrollo preimplantacional pueden ser una de las razones por las que se producen una distorsión de la proporción de sexos de la descendencia tras la exposición a agentes tóxicos y estresantes.

### **3.4. Efecto del estrés térmico sobre el desarrollo embrionario preimplantacional**

#### **3.4.1. Efecto del estrés térmico materno sobre el desarrollo embrionario**

Las situaciones de hipertermia materna durante los primeros estadios de gestación de los animales pueden provocar la muerte de los embriones preimplantacionales (Edwards *et al.* 2001). Este es un fenómeno común en muchas especies de mamíferos como el ganado bovino (Ingraham RH, 1971), porcino (Wildt *et al.* 1975), ovino (Woody and Ulberg, 1964), ratas (Narendranath and Kiracofe, 1975) y ratones (Ozawa *et al.* 2002). La susceptibilidad al estrés térmico se ve incrementada en los animales de mayor producción, así pues, este fenómeno es especialmente pronunciado en las vacas de alta producción lechera debido a su elevado metabolismo y su balance energético (al-Katanani *et al.* 1999; Sartori *et al.* 2002); como consecuencia, la infertilidad causada por el estrés térmico es más severa en estos animales que en el resto de los animales de la explotación. La muerte de los embriones inducida por la hipertermia en las primeras fases del desarrollo embrionario ha sido atribuida a la alta susceptibilidad de los embriones a las elevadas temperaturas maternas (Ealy and Hansen, 1994; Ryan *et al.* 1992) y a la interacción del embrión con el ambiente materno (Matsuzuka *et al.* 2005; Ozawa *et al.* 2002). El estrés térmico materno puede cambiar el estado oxidativo del oviducto, provocando una situación de estrés oxidativo en los embriones (Matsuzuka *et al.* 2005). La elevada temperatura corporal y la elevada tasa metabólica producen un aumento de los radicales libres de oxígeno (RLO), que reaccionan con diferentes biomoléculas como son lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, produciendo daño celular (Wells *et al.* 1997). Estudios que evalúan el efecto del estrés térmico materno sobre el desarrollo embrionario en el ratón han demostrado que se produce un aumento de las concentraciones de peróxido de hidrógeno y un descenso en las concentraciones de glutatión en los cigotos y los embriones en estadio de dos células (Ozawa *et al.* 2002). Entre las consecuencias del estrés oxidativo sobre el desarrollo embrionario se encuentran las siguientes: un descenso en la proporción de los embriones que se desarrollan hasta el estadio de mórula y blastocisto (Ozawa *et al.* 2002), un aumento en el daño del ADN de los embriones en estadio de dos células y un descenso en el número total de células de los blastocistos resultantes (Matsuzuka *et al.* 2005). El

efecto de la hipertermia sobre los embriones preimplantacionales bovinos es más pronunciado en el estadio de cigoto que en los embriones en estadio de mórula y blastocisto.

### **3.4.2. Efecto del estrés térmico *in vitro* sobre el desarrollo embrionario**

Los sistemas de cultivo *in vitro* que exponen directamente a los embriones a altas temperaturas han demostrado que existe una correlación entre la sensibilidad de los embriones al estrés térmico y la adquisición de termotolerancia, la cual es estadio-dependiente (Edwards *et al.* 2001). En embriones de ratón cultivados *in vitro*, la termotolerancia puede ser inducida mediante un shock térmico de corta duración en el estadio de 8 células (Ealy and Hansen, 1994) o en el estadio de mórula (Arechiga and Hansen, 1998). Igualmente a lo observado *in vivo*, cuando los embriones de hámster y de bovino cultivados *in vitro* son expuestos a una situación de estrés oxidativo, se producen alteraciones en el ADN (Takahashi *et al.* 1999), la interrupción del desarrollo embrionario (Guerin *et al.* 2001) y un aumento de los blastómeros apoptóticos en los blastocistos bovinos (Jousan and Hansen, 2004).

La vulnerabilidad de los embriones bovinos al estrés térmico en los estadios de dos y cuatro células ha sido atribuida a la incapacidad de producir ciertas proteínas que protegen al embrión frente al estrés, como son la HSP70, necesaria para que se produzca la termotolerancia inducida, el glutatión (GSH), para la defensa antioxidante (Arechiga *et al.* 1995), o caspasas, para la función apoptótica normal (Paula-Lopes and Hansen, 2002a; Paula-Lopes and Hansen, 2002b).

## **3.5. Consecuencias del estrés térmico escrotal en la espermatogénesis y en el desarrollo embrionario**

### **3.5.1. Circunstancias que provocan el estrés térmico escrotal**

La función testicular normal depende de la temperatura y en la mayoría de los mamíferos los testículos se mantienen entre 2 y 8°C por debajo de la temperatura corporal, alojándose en el escroto (Ivell, 2007). En el ser humano, un aumento de la temperatura testicular puede ocurrir como consecuencia del estilo de vida, ocupación profesional o de un desorden clínico (Mieusset *et al.* 1987). Por ejemplo, se puede producir un aumento de la temperatura testicular en los hombres que trabajan bajo condiciones de temperaturas ambientales muy elevadas y también en profesiones en las que el trabajador permanece sentado durante largos periodos de tiempo, como les ocurre a los conductores profesionales (revisado en Thonneau *et al.* 1998). Estudios recientes también señalan que determinadas costumbres, como por ejemplo llevar ropa muy ajustada pueden causar un aumento en la temperatura escrotal (Mieusset *et al.* 2007). Ciertos desórdenes clínicos, entre los que se incluye la criptorquidia, en la que uno o dos testículos no logran descender al escroto y permanecen en la cavidad abdominal, provocan la exposición de los testículos a temperaturas más elevadas de lo normal.

Con el fin de reproducir las circunstancias que provocan un aumento de la temperatura escrotal y evaluar sus consecuencias, se han diseñado una serie de modelos animales. Entre estos modelos, se encuentra el modelo en el que se expone todo el cuerpo del animal a una temperatura ambiental elevada y otro modelo en el que se somete al animal a estrés térmico escrotal local, este último, a su vez, puede ser realizado mediante la inducción de la criptorquidia, el aislamiento escrotal o el sometimiento a altas temperaturas (más de 40°C) durante un corto período de tiempo, normalmente mediante la inmersión en un baño de agua caliente. En la criptorquidia inducida de forma quirúrgica se sitúan los testículos y los epidídimos dentro de la cavidad abdominal, los testículos se ven expuestos a la temperatura corporal durante largos periodos de tiempo (Yin *et al.* 1997). En animales domésticos de mayor tamaño, los testículos pueden ser sometidos a estrés térmico mediante el aislamiento del escroto, una técnica realizada en moruecos, toros, caballos y cerdos (Mieusset *et al.* 1992a). Sin embargo, introducir los testículos del animal, previamente anestesiado o sedado, en un baño de agua caliente (40-43°C) es el método más preciso de exponer los testículos a un aumento de temperatura (Setchell, 1998). Se ha observado que los distintos modelos elegidos para provocar una situación de estrés térmico escrotal provocan alteraciones en la función testicular (Setchell, 1998).

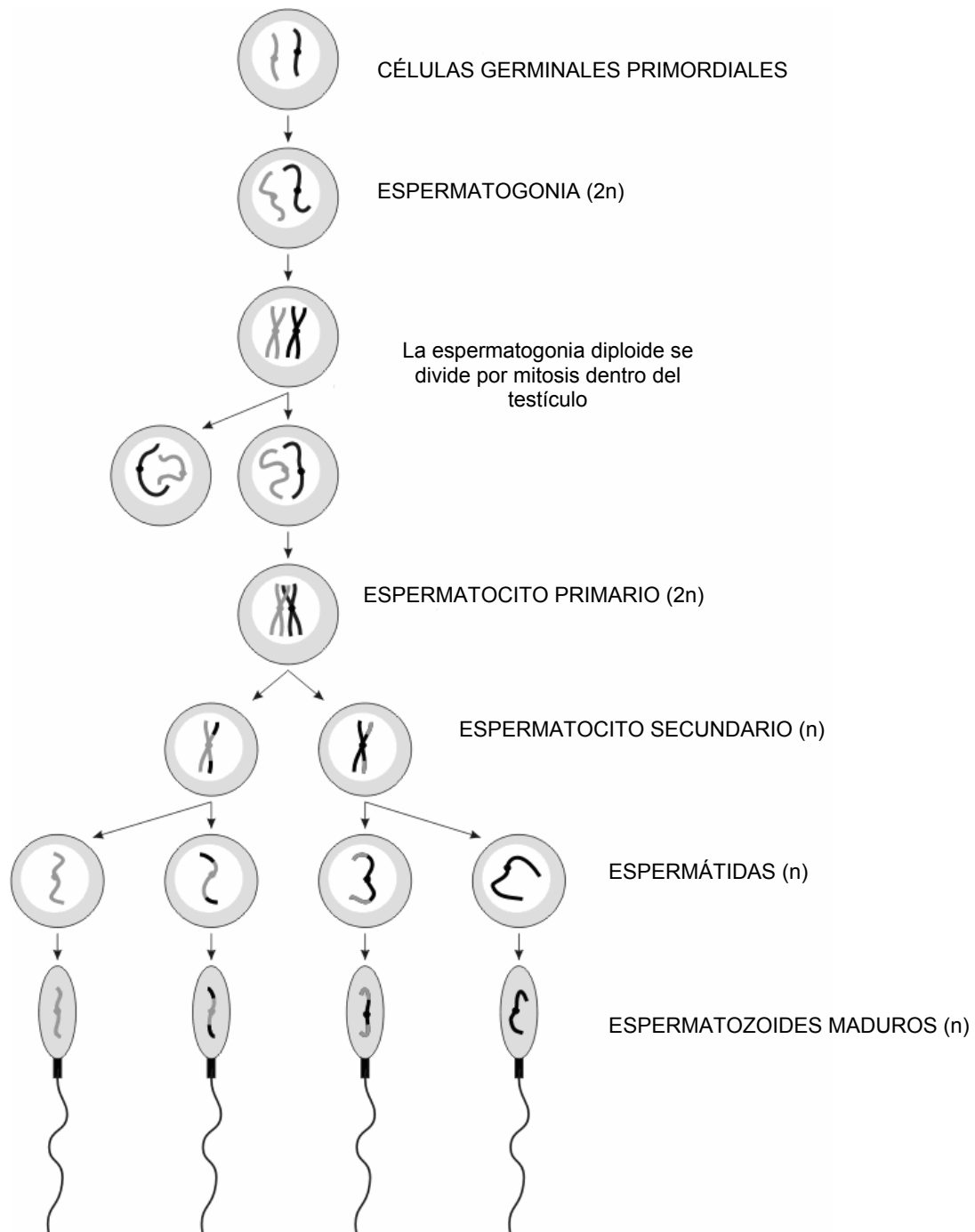
### **3.5.2. Espermatogénesis en el ratón**

El desarrollo de las células germinales masculinas tiene lugar en los testículos de una manera organizada y controlada (Clermont, 1972). La espermatogénesis es un complejo proceso biológico de transformación celular desde células diploides, las espermatogonias, hasta la producción de espermatozoides, células germinales masculinas haploides. La maduración de las células germinales se produce en tres fases: mitótica (replicativa), meiótica y post-meiótica (espermiogénesis) (Fig 3.2) La división mitótica de las espermatogonias (2n) inicia la espermatogénesis y da lugar a espermatocitos en fase de preleptotene, estos espermatocitos se conocen como espermatocitos de primer orden (2n). Después de la síntesis de ADN, el espermatocito en fase de preleptoteno (espermatozocito de primer orden) entra en una profase meiótica larga donde se forman varios tipos celulares, espermatocitos en fase de leptoteno, cigoteno, paquiteno y diploteno. Cada espermatocito de primer orden (2n) mediante división meiótica da lugar a dos espermatocitos de segundo orden (n); a su vez, cada uno de los espermatocitos de segundo orden (n) experimenta la segunda fase de la meiosis dando origen así a cuatro espermátidas redondas (n). Las espermátidas redondas sufren una serie de cambios que se engloban en un proceso llamado espermiogénesis. La espermiogénesis requiere otros 7 días y abarca la transformación morfológica de espermátidas redondas haploides en espermatozoides maduros elongados y altamente condensados que son eliminados en la luz del túbulo seminífero; la espermátida pierde la mayor parte de su citoplasma en el cuerpo residual y adquieren un flagelo para la motilidad, resultando en la formación del espermatozoide; durante la espermiogénesis se produce la sustitución de las histonas por proteínas de transición y éstas, a su vez, son sustituidas

por protaminas, que darán lugar a la compactación del ADN en el núcleo del espermatozoide (Hess, 2007).

Durante el proceso de espermatogénesis que dura aproximadamente 35 días en el ratón y 65-72 días en el ser humano, el ADN de las células germinales es vulnerable a la introducción de errores (Robaire and Hales, 2003); las células germinales que presentan daño en su ADN son eliminadas mediante apoptosis (Lue *et al.* 1999). El reconocimiento de las células no viables se produce gracias a unos mecanismos de control que velan por la calidad cromosómica de los gametos que se forman (Eaker *et al.* 2002); los espermatocitos que no completan la meiosis son eliminados selectivamente por apoptosis; así mismo, son eliminadas las espermatogonias dañadas (Print and Loveland, 2000). Las células germinales apoptóticas son transportadas al lumen del túbulo o bien son fagocitadas por las células de Sertoli.





**Fig 3.2.** Representación esquemática de la espermatogénesis en el ratón. 2n, células diploides, 38 cromosomas autosómicos + cromosomas X e Y. n, células haploides, 19 cromosomas + cromosoma X ó Y (Modificado de Hess *et al.* 2007)

### 3.5.3. Alteraciones en el proceso de la espermatogénesis a causa del estrés térmico

Tras la inducción del estrés térmico escrotal en modelos animales, se ha observado que se producen alteraciones en la función testicular, entre las que se incluyen, un descenso en el peso testicular, pérdida de células germinales, un incremento en la apoptosis celular (Lue *et al.* 1999), un descenso en la concentración, viabilidad y motilidad espermática (Banks *et al.* 2005; Zhu *et al.* 2004) y una reducción de la capacidad fecundante de los espermatozoides que da lugar a un período de infertilidad parcial o completa del animal (Jannes *et al.* 1998; Setchell, 1998; Yaeram *et al.* 2006). Las células afectadas por el estrés térmico escrotal son las células germinales presentes en el testículo y que participan en el proceso de espermatogénesis y los espermatozoides presentes en el epidídimo (Banks *et al.* 2005; Zhu *et al.* 2004). El efecto del estrés térmico sobre las células de la línea germinal masculina depende de la capacidad de estas células de responder al estrés, de reparar su ADN y de la posibilidad de sufrir apoptosis o necrosis (Rockett *et al.* 2001). Las células de cada una de las fases de la espermatogénesis tienen propiedades únicas en cuanto a síntesis de ADN, estructura de las proteínas asociadas a los cromosomas y capacidad de reparar el daño en el ADN (Favor, 1999). Se ha observado que algunas de las células presentes en el testículo en el momento del estrés térmico se eliminan mediante apoptosis (Banks *et al.* 2005; Yin *et al.* 1997), muchas otras células germinales, en cambio, completan su desarrollo y dan lugar a espermatozoides móviles con daño en su ADN (Banks *et al.* 2005). Varios estudios han identificado que los espermatocitos son las células más vulnerables al estrés térmico (Banks *et al.* 2005; De Vita *et al.* 1990; Paul *et al.* 2008).

En el ratón, se ha observado que el aumento de la temperatura escrotal produce alteraciones en la síntesis de ADN, ARN y proteínas, así como un empaquetamiento anormal de la cromatina (Love and Kenney, 1999) y una reducción de la integridad del ADN espermático (Banks *et al.* 2005). A nivel molecular, se ha descrito que el estrés térmico escrotal reduce la expresión de numerosos genes, particularmente de genes implicados en la reparación del ADN y la recombinación, la regulación del ciclo celular y la respuesta al estrés (Rockett *et al.* 2001). La reducción de la expresión de estos genes puede causar que las células germinales sean más susceptibles al daño durante la hipertermia.

### 3.5.4. Consecuencias del estrés térmico paterno sobre el futuro desarrollo embrionario

Entre los efectos que el estrés térmico paterno puede tener sobre el desarrollo embrionario figuran los siguientes: una reducción del desarrollo embrionario preimplantacional *in vitro* (Jannes *et al.* 1998; Setchell *et al.* 1998; Zhu *et al.* 2004) e *in vivo* (Zhu and Setchell, 2004), una reducción en el número de los embriones en estadios post-implantacionales (Yaeram *et al.* 2006), un descenso en el peso de los embriones en ratones (Jannes *et al.* 1998; Setchell *et al.* 1998) y un aumento del número de embriones degenerados en ovejas (Mieusset *et al.*, 1991). En el ganado vacuno se ha visto que la inseminación con espermatozoides de toros a los que se les realizó la

técnica del aislamiento escrotal, aumentaba las proporciones de embriones degenerados y de baja calidad (Walters *et al.* 2006). A su vez, se ha observado que el estrés térmico paterno altera el patrón de expresión de determinadas proteínas que se expresan durante el desarrollo embrionario preimplantacional (Zhu and Maddocks, 2005), hecho que podría explicar algunas de las consecuencias negativas del estrés térmico paternal sobre el desarrollo embrionario y fetal.

### **3.6. Importancia del daño nuclear espermático en la fecundación y en el desarrollo embrionario y fetal**

El ADN del espermatozoide aporta la mitad del material genético a la descendencia y es necesario para la fecundación, el desarrollo del embrión y para el correcto desarrollo fetal y postnatal. Las alteraciones en el material genético espermático pueden incluir, entre otras: defectos en la maduración o condensación nuclear, deficiencias en las protaminas, fragmentación del ADN o defectos en la integridad del ADN (rotura de cadena simple o cadena doble del ADN), sustitución de sitios abásicos y aneuploidías cromosómicas en el espermatozoide (Perreault *et al.* 2003).

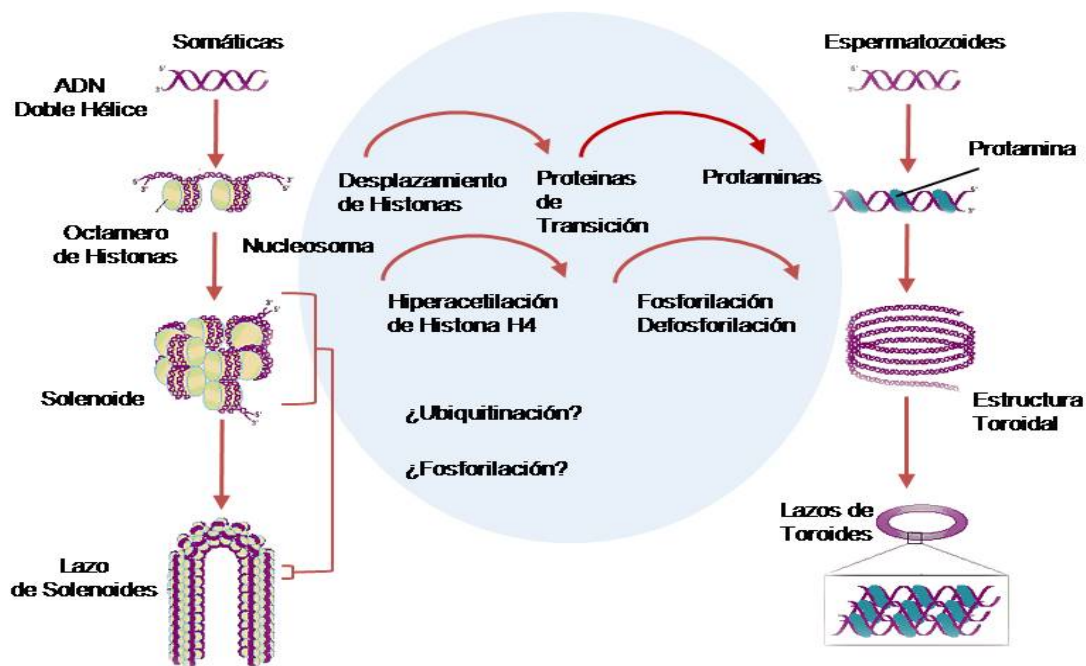
Numerosos autores han descrito que existe una correlación negativa entre las alteraciones en la organización del material genómico en el núcleo espermático y el potencial fecundante de los espermatozoides, tanto *in vivo* como *in vitro* (revisado en Spano *et al.* 2005; Sun *et al.* 1997). Estos resultados apoyan el hecho de que la estabilidad del ADN espermático, que le confiere al espermatozoide la capacidad de descondensarse en el momento adecuado en el proceso de fecundación (McCarthy and Ward, 2000), es uno de los criterios necesarios para considerar que un espermatozoide no tiene alterada su capacidad fecundante (Rodriguez-Martinez, 2007).

#### **3.6.1. Estructura de la cromatina espermática**

La cromatina espermática se diferencia de la cromatina de las células somáticas en su estructura y composición. Se encuentra fuertemente compactada debido a las asociaciones entre el ADN, la matriz nuclear y las nucleoproteínas (Ward and Zalensky, 1996); es aproximadamente unas seis veces más compacta que la cromatina de las células somáticas (Sakkas *et al.* 1999), y se organiza en bucles de menor tamaño que los de estas células. Las principales diferencias en la compactación de la cromatina espermática y de las células somáticas se representan gráficamente en la Fig 3.3. Hud *et al.* (1993,1994) demostraron que la unidad básica de organización del ADN espermático es una estructura toroidal de protaminas unidas al ADN que contiene aproximadamente 50 kb de ADN por cada unidad (Hud *et al.* 1993; Hud *et al.* 1994). Ward *et al.* (1989) demostraron que estas unidades toroidales están organizadas en dominios de bucles, de unos 50 kb, que están anclados a la matriz nuclear proteica (Ward *et al.* 1989). Dichos bucles se compactan por la acción de las protaminas intercaladas, las cuales estabilizan rígidamente la estructura a través de la formación de puentes disulfuro entre ellas. Las protaminas son proteínas características de las células espermáticas que reemplazan, durante la maduración de los

espermatozoides, a la mayoría de las proteínas estructurales conocidas como histonas (Ward and Coffey, 1989; Ward and Coffey, 1991). Durante la espermiogénesis, se produce la remodelación de la cromatina, produciéndose un empaquetamiento de la misma (Ward and Coffey, 1991), las histonas se sustituyen por proteínas de transición, y éstas, a su vez, por protaminas mediante la actividad de nucleasas endógenas y ligasas (McPherson and Longo, 1993a; McPherson and Longo, 1992; McPherson and Longo, 1993b). Las protaminas son ricas en grupos tiol (o sulfidril); existen dos clases de protaminas en el ratón y en otros mamíferos, protaminas 1 y 2. Durante la reorganización de la cromatina, se forman fragmentos de la cadena de ADN de pequeño tamaño, endógenos y temporales (McPherson and Longo, 1993b); aunque el proceso de formación y reparación no se conoce con exactitud (Marcon and Boissonneault, 2004), Mc Pherson & Longo (1993) postularon que la ADN topoisomerasa II es la endonucleasa responsable de crear y ligar los fragmentos de ADN durante la espermiogénesis y la función de estos fragmentos parece ser la eliminación del superenrollamiento del ADN durante su condensación (Henkel *et al.* 2004; Sakkas *et al.* 1999). Los datos de estos experimentos sugieren que el reemplazo de las histonas por las protaminas se completa antes de la entrada de los espermatozoides en los tubos eferentes. A lo largo del tránsito en el epidídimo, se produce una maduración nuclear final mediante la formación de los puentes disulfuro intermoleculares e intramoleculares entre las protaminas ricas en cisteínas que permiten la estabilización y compactación de la cromatina en los espermatozoides eyaculados (Fuentes-Mascorro *et al.* 2000; Lewis and Aitken, 2005; Oliva, 2006; Zini and Libman, 2006). La estructura nuclear espermática protege la integridad genómica durante el transporte del genoma paterno a través del tracto reproductor masculino y femenino, evitando que el genoma espermático sea dañado por condiciones estresantes como la oxidación o una elevación excesiva de la temperatura. La protección que confiere esta estructura compensa de alguna forma la incapacidad de los espermatozoides de reparar su ADN.

Al mismo tiempo, el correcto empaquetamiento de la cromatina espermática es necesario para una correcta reprogramación del genoma paterno y una apropiada organización de los genes que serán expresados en los primeros estadios del desarrollo embrionario (Larson *et al.* 2000; McCarthy and Ward, 2000; Ward and Zalensky, 1996). Así pues, en el momento de la fecundación, se produce la descondensación del ADN, el ovocito debe remodelar la estructura de la cromatina espermática y convertirla en una forma transcripcionalmente activa (McLay and Clarke, 2003). Esta remodelación de la cromatina conlleva la sustitución de las protaminas por histonas (McLay and Clarke, 2003). La cromatina finaliza su proceso de descondensación cuando las histonas se organizan en nucleosomas (McLay and Clarke, 2003).



**Fig 3.3.** Modelo de compactación de la cromatina en las células somáticas (izquierda) y en los espermatozoides de mamífero (derecha) (Modificado de Braun *et al.* 2001).

### 3.6.2. Factores implicados en el daño nuclear espermático

Existen numerosos factores, tanto endógenos como exógenos, que pueden ocasionar alteraciones en la estructura de la cromatina espermática. Se han propuesto cuatro mecanismos que pueden comprometer o dañar la cromatina espermática: la incorrecta compactación de la cromatina, la apoptosis defectuosa, el estrés oxidativo y las lesiones genéticas (revisado en Agarwal and Said, 2003; revisado en Lewis and Aitken, 2005; Sharma *et al.* 2004). A continuación, se detallan los tres primeros mecanismos que pueden ocasionar alteraciones en la cromatina espermática, así como otros factores que pueden estar implicados como son las caspasas, las nucleasas y los factores ambientales.

#### 3.6.2.1. Incorrecta compactación de la cromatina

La compactación de la cromatina se refiere a la estructura, altamente compleja y específica, en la que se organiza el ADN nuclear espermático para poder transmitir correctamente la información genética. Aunque los defectos pueden originarse en cualquiera de los cuatro niveles de empaquetamiento, los problemas más comunes surgen durante la formación de los dominios

de bucles y en el reemplazo de las histonas por protaminas (Gorczyca *et al.* 1993; Manicardi *et al.* 1998; Sailer *et al.* 1995).

### **3.6.2.2. Apoptosis defectuosa**

La muerte celular programada o apoptosis ocurre durante las tres fases de la espermatogénesis, pero, la maquinaria celular que permite que estas células sufran una apoptosis completa y sean eliminadas, se pierde progresivamente durante la espermatogénesis, y, por lo tanto, durante los estados avanzados de diferenciación de las células germinales los espermatozoides defectuosos no pueden ser eliminados (Braun, 1998). Se cree que la apoptosis tiene dos funciones principales durante el proceso de la espermatogénesis normal (Seli *et al.* 2004; Sharma, 2004; Spano *et al.* 2005); la primera función es limitar la población de células germinales a números que puedan ser tolerados por las células de Sertoli, mientras que la segunda función es eliminar los espermatozoides defectuosos. El fallo en la eliminación de las células germinales anormales durante la espermatogénesis puede ser la causa de la presencia en el eyaculado de espermatozoides con su ADN dañado (Sakkas *et al.* 1999; Sakkas *et al.* 2002)

### **3.6.2.3. Estrés oxidativo**

El estrés oxidativo en el tracto reproductor masculino se produce como consecuencia de un exceso de los radicales libres de oxígeno (RLO) que están presentes en los fluidos del tracto genital masculino (revisado en Tesarik *et al.* 2006), como consecuencia de un desajuste entre la producción de RLO y la capacidad antioxidante (Wang *et al.* 2003). Los espermatozoides son particularmente susceptibles al estrés oxidativo debido al alto contenido en ácidos grasos insaturados en sus membranas, así como debido al limitado almacenamiento de enzimas antioxidantes (Baker and Aitken, 2005). Su susceptibilidad al estrés oxidativo se ve incrementada cuando la compactación de la cromatina es incorrecta, lo que causa un mayor daño al genoma (revisado en Aitken and Krausz, 2001). En condiciones fisiológicas, este tipo de daño no es preocupante ya que se produce un daño colateral peroxidativo de la membrana de los espermatozoides que asegura que los espermatozoides afectados no puedan participar en la fecundación (Aitken and Krausz, 2001). Sin embargo, con el empleo de las técnicas de reproducción asistida estos espermatozoides con daño en el ADN sí que pueden participar en la fecundación (Lopes *et al.* 1998b; Saleh *et al.* 2003; Twigg *et al.* 1998).

### **3.6.2.4. Activación de caspasas y nucleasas**

Las caspasas y endonucleasas se pueden activar en espermatozoides por factores físico-químicos. Algunos autores han sugerido que los espermatozoides maduros contienen nucleasas que pueden ser activadas bajo ciertas condiciones (Maione *et al.* 1997; Sakkas *et al.* 2002; Tateno *et al.* 2000). Sotolongo *et al.* (2005) reportaron la existencia de endonucleasas endógenas en

espermatozoides maduros de ratón, hámster y seres humanos, que digieran el ADN espermático en fragmentos de aproximadamente 50 kb. Las nucleasas endógenas pueden ser liberadas por espermatozoides con la membrana dañada (Ward and Ward, 2004) o bien activadas por estímulos externos como la presencia de ADN exógeno (Maione *et al.* 1997). Esta acción puede ser evitada mediante la preincubación con inhibidores de las nucleasas como el ácido aurintricarboxílico (Zaccagnini *et al.* 1998). La acción de estas endonucleasas requiere la presencia de iones como  $\text{Ca}^{2+}$  o  $\text{Mg}^{2+}$  (Szczygiel *et al.* 2003).

Además de los mecanismos mencionados, determinadas situaciones y sustancias han sido identificadas en relación con un aumento de la fragmentación del ADN de los espermatozoides: el uso de ciertos fármacos, la contaminación atmosférica, el tabaquismo, los episodios de fiebre alta, una temperatura testicular elevada, anomalías tales como el varicocele o una edad avanzada (Enciso *et al.* 2006; Ji *et al.* 1997; Rubes *et al.* 2005).

### 3.6.3. Metodologías para la detección de anomalías en la cromatina espermática

En los últimos años, uno de los objetivos de muchos trabajos de investigación y de las clínicas de reproducción asistida es poder determinar el grado de fragmentación del ADN de los espermatozoides en los animales y en el ser humano mediante una tecnología rápida, eficaz y de coste asequible para poder utilizar este parámetro, junto con los parámetros clásicos, en la determinación rutinaria de la calidad seminal; además, se han propuesto establecer para cada una de las especies, cuál es el grado de fragmentación del ADN de los espermatozoides a partir del cual la fertilidad del individuo puede verse afectada. Existen dos estrategias para la detección del daño nuclear en las muestras espermáticas. Por una parte se agrupan los métodos que miden de forma indirecta la fragmentación del ADN; se incluyen aquellas tecnologías que miden la capacidad diferencial que presenta la cromatina para desnaturalizarse frente a determinados tratamientos. En este grupo se incluyen técnicas tales como el análisis de la estructura cromatinica del espermatozoide (Sperm Chromatin Structure Assay, SCSA) (Evenson *et al.* 1999), el test de dispersión de la cromatina del espermatozoide (Sperm Chromatin Dispersión, SCD) (Fernandez *et al.* 2005a; Fernandez *et al.* 2003), el test CMA3 que detecta espermatozoides que tienen un nivel deficiente de empaquetamiento en su cromatina (Manicardi *et al.* 1995), y la tinción de ADN con naranja de acridina que detecta el grado de desnaturalización del ADN (Tejada *et al.* 1984). En segundo lugar se agrupan las metodologías que miden de forma directa el daño en el ADN; se incluyen aquellas metodologías encaminadas a marcar las roturas en la cadena de ADN, tanto de cadena sencilla como de cadena doble, incorporando marcadores en ciertos extremos de la rotura. Dentro de este grupo, se pueden incluir, como de especial importancia, el uso de procesos enzimáticos para la incorporación in situ de nucleótidos marcados, tales como el marcaje terminal con dUTP (Terminal dUTP Nick-End Labelling, TUNEL) (Gorczyca *et al.* 1993), la detección mediante hibridación in situ de roturas del ADN (DNA Breakage Detection-Fluorescence *In Situ* Hybridization, DBD-FISH) (Fernandez *et al.* 2000), o el marcaje interno mediante desplazamiento de mella (*In Situ* Nick Translation, ISNT) (Gorczyca *et al.* 1993). Dentro de los métodos que

cuantifican de forma directa el daño del ADN se encuentra también el ensayo “COMET” o Cometa en el que se realiza una electroforesis de células individuales para el análisis del ADN; este ensayo se conoce en inglés como Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE) (Singh *et al.*, 1988).

Las principales técnicas empleadas para la detección de anomalías en la cromatina espermática se representan en la Tabla 3.1.

#### **3.6.3.1. Análisis de la estructura de la cromatina del espermatozoide (SCSA)**

La técnica desarrollada por Evenson *et al.* (1980) hace más de 25 años, se viene considerando como el referente para el análisis de la fragmentación del ADN en el espermatozoide (Evenson *et al.* 1980). La técnica SCSA se basa en un principio por el cual los espermatozoides con cromatina anormal presentan una mayor susceptibilidad *in situ* a desnaturalizarse parcialmente tras aplicar un tratamiento con calor o una solución ácida (Evenson *et al.* 2002). La segunda parte de la metodología se fundamenta en las características metacromáticas de la naranja de acridina. Este fluorocromo tiene la capacidad de intercalarse entre las dos cadenas de ADN como un monómero, que al ser excitado emite en verde, pero que presenta emisión en color rojo-anaranjado si se incorpora al ADN de cadena sencilla. Las células así teñidas se someten a citometría de flujo para discernir entre ambos tipos de color. Su aplicación está relativamente extendida en humanos y también se ha ensayado para el estudio de la fragmentación del ADN en muestras de semen procedentes de animales con interés ganadero tales como ganado porcino y bovino (Boe-Hansen *et al.* 2005). Esa técnica es la más aceptada para establecer correlaciones entre fragmentación del ADN y fertilidad de un individuo. El grupo del Dr. Evenson ha establecido que individuos con un índice de fragmentación en su ADN de alrededor de un 30% o superior, presentaría problemas de fertilidad (Evenson, 1999). El inconveniente que tiene esta técnica es que no es accesible a la mayoría de los laboratorios, ya que requiere la utilización de la citometría de flujo.

#### **3.6.3.2. Ensayo COMET o Cometa**

El ensayo Cometa se basa en la aplicación de un tratamiento de descondensación del ADN del espermatozoide en el seno de un gel y, posteriormente, su sometimiento a la acción de un campo eléctrico en el que las moléculas de ADN se desplazan y generan una imagen en forma de cometa. La metodología básica consiste en incluir una muestra de espermatozoides en un microgel de agarosa sobre un portaobjetos y someterlo a una solución de lisis que contenga un agente reductor de los grupos sulfidrilos que se encuentran en las protaminas del espermatozoide, se utiliza por ejemplo DTT (dithiothreitol). Tras la electroforesis, el microgel se tiñe con sondas fluorescentes tipo DAPI (4,6 diamino-2-phenylindole), IP (Ioduro de Propidio) o SYBR-GREEN. Aquellos espermatozoides con su ADN íntegro no generan o sólo producen imágenes de discretas colas de cometa, mientras que aquellos núcleos que tienen su ADN dañado muestran un claro desplazamiento de los múltiples fragmentos de ADN (Singh *et al.* 1988). El ensayo de COMET



alcalino permite detectar roturas de cadena doble y cadena sencilla, mientras que el ensayo COMET neutro permite detectar sólo roturas de cadena doble. Al igual que ocurre con otras pruebas, esta técnica se emplea principalmente en investigación, pero tiene la ventaja de que se puede adaptar de forma sencilla para el análisis de muestras de semen de cualquier especie (Fraser, 2004). El mayor inconveniente de este ensayo es que requiere un material de uso no común en un laboratorio de andrología, como son fuentes de electroforesis y para la interpretación de los resultados se requiere un observador con experiencia o bien un software específico para que la prueba tenga cierta objetividad.

#### **3.6.3.3. Ensayo TUNEL**

El ensayo TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyUridine-Nick End Labeling) se basa en el principio por el que el enzima desoxinucleotidil transferasa Terminal (TdT) incorpora dUTP (desoxiuridina trifosfato) en roturas de cadenas dobles o simples del ADN. En concreto, en el ensayo se incorpora desoxiuridina biotinilada o marcada con un fluorocromo al 3'OH del ADN. A través de técnicas de fluorescencia o de inmunofluorescencia se identifican los espermatozoides con el ADN dañado. Teóricamente, la señal de marcado obtenida por cada espermatozoide, se incrementaría de acuerdo con el número de roturas que presente la cadena de ADN (Lopes *et al.*, 1998b). Los espermatozoides con ADN fragmentado (múltiples 3'OH terminales) se tiñen con una fluorescencia intensa (Gorczyca *et al.* 1993). La fluorescencia puede detectarse tanto por citometría de flujo como a través de microscopía de fluorescencia. (Lopes *et al.* 1998b). El ensayo también puede analizarse en microscopio de campo claro utilizando complejos como el de avidina-biotina-peroxidasa. El ensayo TUNEL es uno de los más utilizados para medir las anomalías del ADN. En varios estudios se ha demostrado una correlación inversa entre el porcentaje de espermatozoides con ADN fragmentado detectados mediante TUNEL y la concentración, motilidad y morfología de los espermatozoides presentes en el eyaculado (Sun *et al.* 1997). También se ha señalado su utilidad como herramienta en el pronóstico del éxito de las técnicas de reproducción asistida (Benchaiib *et al.* 2003; Muratori *et al.* 2003; Sun *et al.* 1997). Su principal uso se restringe al campo de la investigación y todavía no se ha expandido en la rutina clínica ya que requiere un equipo sofisticado para su análisis y personal especializado.

#### **3.6.3.4. Test de dispersion de la cromatina (SCD)**

La idea base del test SCD reside en producir una descondensación diferencial de la cromatina entre aquellos espermatozoides que presentan su ADN fragmentado con respecto a aquellos que lo mantienen intacto. Se ha comprobado que, tras un tratamiento ácido previo, aquellos espermatozoides con ADN fragmentado no sueltan o ven impedida en gran medida la liberación de los bucles de ADN, mostrando halos muy reducidos o ausencia de los mismos, al contrario que los espermatozoides sin fragmentación del ADN (Fernandez *et al.* 2003). Valorando el tamaño de los halos de dispersión de la cromatina, mediante microscopía tanto de campo claro

como de fluorescencia, es posible reconocer la presencia de fragmentación del ADN en los espermatozoides (Fernandez *et al.* 2005b). La principal ventaja de esta técnica es que la interpretación de los resultados no requiere la determinación de color, ni de intensidad de fluorescencia y no necesita de un equipo complejo, ni de personal especializado.

#### **3.6.3.5. Ensayo *in situ* nick translation (ISNT)**

El análisis de *in situ* nick translation (ISNT) cuantifica la incorporación de dUTP marcado (biotinilado o con marcadores fluorescentes o radioactivos) a las roturas del ADN de cadena sencilla en una reacción catalizada por la polimerasa I. El ensayo ISNT detecta los espermatozoides que contienen valores apreciables de daño endógeno en su ADN. Es una técnica de concepción similar al TUNEL; la mayor diferencia con el TUNEL radica en que, en este caso, existe una actividad enzimática exonucleasas y la incorporación de nucleótidos es mayor por utilizar la cadena de ADN complementaria como molde. Los resultados del análisis de ISNT indican la presencia de anomalías originadas durante la remodelación de la cromatina del espermatozoide (Gorczyca *et al.* 1993). Desde el punto de vista práctico, esta técnica tiene las mismas prestaciones e inconvenientes que la de TUNEL, pero no existe disponible de modo comercial para su aplicación directa sobre espermatozoides.

#### **3.6.3.6. DNA Breakage Detection-Fluorescence *In Situ* Hybridization (DBD-FISH)**

Se trata de una metodología relativamente reciente y que se circunscribe al campo de la investigación. Se fundamenta en la capacidad que tienen ciertas soluciones alcalinas de producir una desnaturalización del ADN a partir de los extremos de roturas de doble cadena o de cadena sencilla, o bien lugares sensibles al álcali. Después de la desnaturalización y extracción de las protaminas utilizando una solución de lisis, el ADN generado de cadena sencilla, puede hibridarse con una sonda de ADN. Cuantas más roturas existan en dicha cadena, mayor será el nivel de marcado que se obtenga en el núcleo (Fernandez *et al.* 2000). Al igual que las técnicas de TUNEL o ISNT, la técnica de DBD- FISH no se puede considerar de aplicación rutinaria. Desde el punto de vista de la investigación, tiene mucho interés, ya que es la única técnica disponible que nos permite evaluar daño de célula a célula, *in situ*, en secuencias específicas del ADN (Fernandez and Gosálvez, 2002).

#### **3.6.3.7. Test de naranja de acridina**

Utilizando las propiedades metacromáticas de la naranja de acridina, algunos investigadores han aplicado el mismo principio que el utilizado en el SCSA para visualizar los espermatozoides con ADN fragmentado empleando microscopía de fluorescencia (Gopalkrishnan *et al.* 1999; Tejada *et al.* 1984). El mayor problema de esta técnica es el componente de la subjetividad del observador en el momento de discriminar entre la emisión del color verde y del naranja de este

florocromo, dado que existe toda una serie de colores intermedios que probablemente se relacionan con una sensibilidad diferencial a la desnaturalización de los distintos espermatozoides. Además los resultados no parecen muy reproducibles, ya que parecen variar con el tiempo.

**Tabla 3.1.** Técnicas más comunes utilizadas para la detección de anomalías en la cromatina espermática: principio de la técnica, tipo de daño evaluado y método común de detección.

<b>Técnica</b>	<b>Principio</b>	<b>Tipo de daño detectado</b>	<b>Método común de detección</b>
<b>Análisis de la estructura de la cromatina del espermatozoide (SCSA)</b>	Susceptibilidad de la cromatina espermática a la desnaturalización ácida	Compactación y daño en la cromatina espermática	Citometría de flujo
<b>COMET</b>	Inmovilización de espermatozoides en microgel de agarosa. Aplicación de solución con agentes reductores. Migración del ADN fragmentado fuera de la cabeza espermática tras electroforesis	Presencia de roturas en la cadena de ADN	Microscopio de fluorescencia
<b>TUNEL</b>	Marcaje de los extremos 3-OH' libres por la incorporación mediante la enzima TdT de nucleótidos marcados	Presencia de roturas en el ADN de cadena simple y doble	Citometría de flujo/Microscopio de fluorescencia
<b>Sperm Chromatin Dispersion Test (SCD)</b>	Evaluación de la presencia y características de los halos formados tras someter a los espermatozoides a una desnaturalización ácida	Compactación de la cromatina	Microscopio de fluorescencia y microscopio de campo claro
<b>In Situ Nick Translation (ISNT)</b>	Incorporación mediante la enzima ADN polimerasa de moléculas de dUTP marcado en los extremos de las roturas del ADN	Presencia de roturas en el ADN de cadena simple	Citometría de flujo/Microscopio de fluorescencia
<b>DBD-FISH</b>	Hibridación, con una sonda de ADN marcado, de las roturas generadas tras someter al ADN a una solución alcalina	Roturas en el ADN. Daño <i>in situ</i> en secuencias específicas del ADN	Microscopio de fluorescencia
<b>Naranja de acridina</b>	Diferenciación entre ADN de cadena sencilla o cadena doble	Compactación de la cromatina	Citometría de flujo/Microscopio de fluorescencia

### **3.6.4. Efecto del daño nuclear espermático en la fertilidad y en el desarrollo embrionario**

#### **3.6.4.1. Relación entre el daño nuclear espermático y los parámetros espermáticos**

Muchos autores coinciden en reconocer que hay una correlación negativa entre los parámetros de motilidad y viabilidad espermática y los índices de fragmentación del ADN tanto en los animales como en los seres humanos (Huang *et al.* 2005; Irvine *et al.* 2000; Kodama *et al.* 1997; Saleh *et al.* 2003; Tomlinson *et al.* 2001).

#### **3.6.4.2. Relación entre el daño nuclear espermático y el éxito en la fecundación**

El daño nuclear espermático está claramente asociado con la infertilidad en seres humanos (Agarwal and Said, 2003; Aitken and Baker, 2004), pero un pequeño porcentaje de espermatozoides de seres humanos fértiles poseen niveles detectables de daño en el ADN (Kodama *et al.* 1997; Spano *et al.* 2000; Zini *et al.* 2001). También se ha detectado una relación entre el daño nuclear espermático y un descenso en la fertilidad en los animales domésticos (Boe-Hansen *et al.* 2008; Fraser, 2004; Kasimanickam *et al.* 2006a; Kasimanickam *et al.* 2006b; Morrell *et al.* 2008).

Se ha señalado que cuando el estrés oxidativo es bajo provoca daño del ADN espermático, sin embargo, los espermatozoides siguen teniendo su capacidad de fecundar intacta (Aitken *et al.* 1998). Cuando el estrés oxidativo es elevado provoca un daño severo en el ADN espermático; los espermatozoides pierden su capacidad fecundante debido al estrés oxidativo colateral de la membrana plasmática (Aitken *et al.* 1998); este hecho se corrobora con los resultados de estudios clínicos que indican que el éxito de la fecundación *in vitro* se correlaciona negativamente con el nivel de daño del ADN espermático (Benchabib *et al.* 2003; Host *et al.* 2000; Huang *et al.* 2005; Payne *et al.* 2005; Sun *et al.* 1997). Sin embargo, no se observa el mismo resultado cuando la técnica empleada es la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI). ICSI es una técnica de reproducción asistida que consiste en la inyección de un espermatozoide en el interior del ovocito utilizando un micromanipulador bajo visión microscópica; con esta técnica, se consigue una fecundación exitosa, incluso con espermatozoides que presentan un cierto daño en su ADN (Aitken and Baker, 2004; Host *et al.* 2000; Lopes *et al.* 1998a; Sun *et al.* 1997; Twigg *et al.* 1998; Zini *et al.* 2005). Estos resultados son probablemente debidos a que con la utilización de ICSI, la fecundación no depende de la competencia funcional de los espermatozoides en términos de su habilidad para capacitarse, llevar a cabo la reacción acrosómica, penetrar la zona pelúcida o fusionarse con la membrana vitelina del ovocito. Con la técnica de ICSI se sobrepasa los mecanismos de selección espermática natural y se incrementan las posibilidades de que un espermatozoide con su ADN dañado pueda fecundar un ovocito (Aitken, 1999; Fischer *et al.* 2003).

#### **6.4.3. Relación entre el daño nuclear espermático y el desarrollo embrionario preimplantacional**

Los ovocitos y los embriones en estadio preimplantacional tienen capacidad para reparar las anomalías en el ADN de los espermatozoides (Ahmadi and Ng, 1999b; Genesca *et al.* 1992; Matsuda *et al.* 1989; Shimura *et al.* 2002a; Shimura *et al.* 2002b). En consecuencia, el efecto biológico del daño nuclear de los espermatozoides depende del grado de daño presente y de la capacidad del ovocito de repararlo. La fecundación de ovocitos en metafase II con espermatozoides con alteraciones del ADN podría conducir a alteraciones en el desarrollo del embrión, fallos en la implantación, o a un aumento en la tasa de abortos (Evenson, 1999; Genesca *et al.* 1992; Sun *et al.* 1997; Twigg *et al.* 1998). Ovocitos maduros, con los mecanismos de reparación de ADN intactos, tienen la capacidad de reparar un daño moderado de ADN en los espermatozoides (Matsuda *et al.* 1989). Sin embargo, ovocitos inmaduros, ovocitos envejecidos u ovocitos cuyos mecanismos de reparación no funcionen de forma adecuada (p.ej. los ovocitos de mujeres de edad avanzada) o que hayan sido dañados por factores tóxicos endógenos (p.e., radicales libres) o exógenos (p.e., tabaco, radiación, tóxicos ambientales) pueden no ser capaces de reparar este daño (Menezo, 2006; Zheng *et al.* 2005). Además, se ha descrito la existencia de un valor limitante de fragmentación del ADN espermático, a partir del cual el daño del ADN no puede ser reparado (Ahmadi and Ng, 1999b).

La influencia del daño nuclear espermático en el desarrollo embrionario y fetal es un asunto prioritario en las líneas de investigación trazadas con el fin de evaluar la seguridad de las técnicas de reproducción asistida. Mientras que existe controversia acerca del impacto de la fragmentación del ADN en la tasa de fecundación (Benchai *et al.* 2003; Hammadeh *et al.* 2006; Host *et al.* 2000; Huang *et al.* 2005; Lopes *et al.* 1998a; Saleh *et al.* 2003; Sun *et al.* 1997; Tomlinson *et al.* 2001; Twigg *et al.* 1998), numerosos estudios afirman que la fragmentación del ADN espermático tiene un impacto negativo sobre el desarrollo embrionario y la tasa de gestación (Ahmadi and Ng, 1999a; Barroso *et al.* 2000; Borini *et al.* 2006; Bungum *et al.* 2004; Carrell *et al.* 2003a; Carrell *et al.* 2003b; Fatehi *et al.* 2006; Larson *et al.* 2000; Sakkas *et al.* 1998). Las alteraciones del desarrollo embrionario están presuntamente asociadas con la transcripción defectuosa de los genes dañados en el genoma paterno (Tesarik *et al.* 2004). En los ciclos de reproducción asistida, en los que se llevan a cabo las técnicas de FIV o ICSI, existe una correlación negativa entre el desarrollo preimplantacional y el daño nuclear espermático evaluado por diversas metodologías como *In situ* nick translation (Sakkas *et al.* 1998), ensayo Cometa (Morris *et al.* 2002), TUNEL (Ahmadi and Ng, 1999a; Sun *et al.* 1997) y SCSA (Bungum *et al.* 2004; Saleh *et al.* 2003; Virro *et al.* 2004). Algunos trabajos han señalado que la fragmentación del ADN espermático no siempre va asociada a una alteración de la morfología embrionaria (Benchai *et al.* 2003; Tesarik *et al.* 2004) y, sin embargo, causa efectos negativos sobre el desarrollo fetal (Tesarik *et al.* 2004). Al igual que el daño nuclear espermático dificulta el desarrollo embrionario, la implantación embrionaria también se ve afectada negativamente (Borini *et al.* 2006; Moskovtsev *et al.* 2005); incluso en los ciclos de inseminación

artificial en seres humanos, la fragmentación del ADN se correlaciona negativamente con la tasa de implantación (Duran *et al.* 2002).

#### **6.4.5. Relación entre el daño nuclear espermático y la salud de los individuos de la descendencia**

A pesar de que los espermatozoides con anomalías en el ADN muestren una reducida capacidad fecundante y su presencia se asocie a una disminución en la tasa de gestación, existe la posibilidad de que los espermatozoides con un elevado grado de daño nuclear sean capaces de fecundar y dar lugar a individuos viables cuando se utilizan técnicas como ICSI, donde se eliminan las barreras de la selección natural (Twigg *et al.* 1998; Gandini *et al.* 2004). Cuando se dan estas circunstancias, se ha propuesto que se puede observar en la descendencia un aumento significativo de la incidencia de ciertas enfermedades, tales como la propia infertilidad (Aitken y Krausz, 2001; Silber y Repping, 2002), cáncer infantil (Sorna *et al.* 1997; Ji *et al.* 1997; Zenzes, 1999; Arnon, 2001; Marchetti and Wyrobeck, 2005) o ciertas enfermedades de impronta genómica anormal (Cox *et al.* 2002).

**CAPÍTULO I. La expresión del gen glucosa-6-fosfato deshidrogenasa participa en la diferente sensibilidad de los embriones de ratón de distinto sexo al estrés oxidativo promovido por calor**

Differential Sensitivity of Male and Female Mouse Embryos to Oxidative Induced Heat Stress is Mediated by Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Gene Expression (2005) *Molecular Reproduction and Development* 72(4):502-510





#### 4.1. Resumen

Durante el periodo preimplantacional, los embriones de sexo masculino cultivados *in vitro* se diferencian de los embriones de sexo femenino en parámetros como la tasa metabólica, la expresión génica y la velocidad de desarrollo. Se ha sugerido que, bajo ciertas condiciones de estrés, los embriones de sexo masculino son más vulnerables que los del sexo femenino; sin embargo se desconocen las causas biológicas de la mayor fragilidad de los embriones de sexo masculino. Muchas de las situaciones de estrés están relacionadas con un aumento en la cantidad de radicales libres de oxígeno (RLO). Nuestra hipótesis de trabajo es que la mayor supervivencia de los embriones de sexo femenino en situaciones estresantes, puede estar relacionada con la cantidad relativa de RLO y con la expresión diferencial de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (*G6pdx*), un gen ligado al cromosoma X y relacionado con el estrés oxidativo

Se eligió el estrés térmico aplicado sobre los embriones cultivados *in vitro* o sobre las hembras en los primeros días de gestación (*in vivo*), como una forma de inducir estrés oxidativo a los embriones preimplantacionales. Tras la compactación de los embriones, se observó una mayor supervivencia de los embriones de sexo femenino. En el experimento *in vitro*, se comprobó que estos embriones presentaban concentraciones relativas de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) inferiores a los embriones de sexo masculino. Se puso de manifiesto la existencia de un descenso en la velocidad de desarrollo de los embriones de sexo femenino producidos *in vitro* comparándolos con los embriones de sexo masculino. A su vez, encontramos diferencias significativas entre sexos en la abundancia relativa de ARNm de *G6pdx* y de otros genes autosómicos, como el gen de sarcosina oxidasa (*Sox*), de Bcl-2 ligado al cromosoma X (*Bax*) y de octámero-4 (*Oct-4*). Para atribuir a la actividad enzimática G6PD este efecto protector frente al estrés térmico, se inhibió mediante el uso de dehidroepiandrosterona (DHEA). Se comprobó que tras la inhibición de G6PD, las diferencias inicialmente observadas entre embriones de distinto sexo, desaparecían.

Se demostró experimentalmente que *G6PD* interviene en los mecanismos por los cuales los embriones preimplantacionales de sexo femenino son más resistentes que los de sexo masculino ante situaciones de estrés térmico.



## 4.2 Diseño experimental

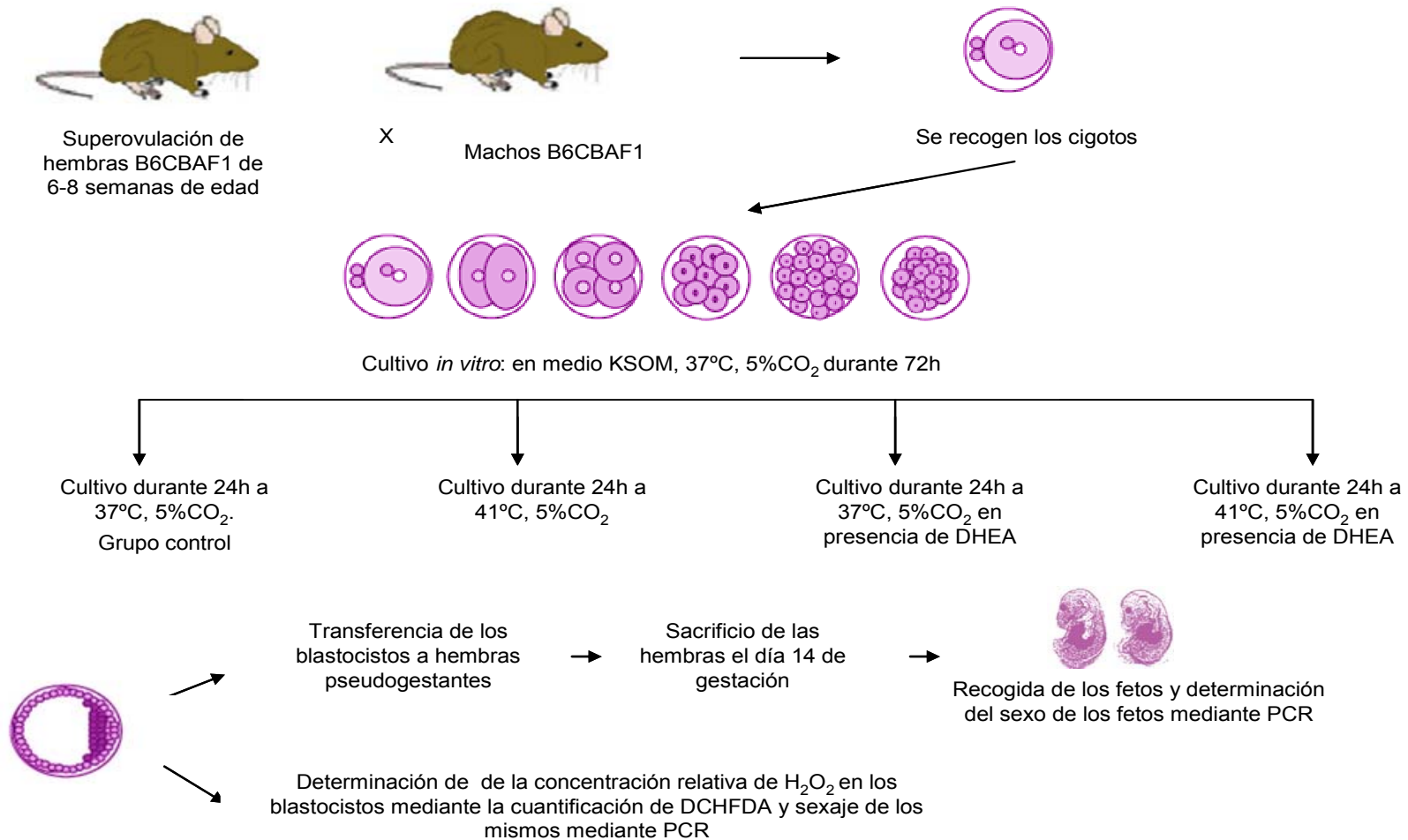
El primer capítulo experimental de esta tesis se divide en cinco experimentos. Los cuatro primeros experimentos se realizaron con embriones cultivados *in vitro*, el quinto experimento tuvo por objeto de ensayo las hembras en los primeros días de gestación, éstas fueron sometidas a una situación de estrés térmico ambiental con el fin de evaluar el efecto del tratamiento térmico sobre los embriones *in vivo*.

En todos los experimentos realizados *in vitro*, con el fin de comprobar si existían diferencias entre embriones de distinto sexo que estuvieran relacionadas con G6PD, se decidió incluir un grupo de embriones cultivados en medio que contenía 10  $\mu$ M de dehidroepiandrosterona (DHEA) un inhibidor de G6PD (Downs *et al.* 1998; Gordon *et al.* 1995; Kimura *et al.* 2005). Los dos primeros experimentos fueron diseñados para determinar cómo se veían afectados por el estrés térmico los embriones de distinto sexo cultivados *in vitro* y la posible implicación de los RLO. En primer lugar (experimento 4.1) se analizó cuál era la supervivencia de los embriones de sexo masculino y femenino tras la aplicación del estrés térmico (41°C durante 24 horas) mediante la determinación del sexo de los fetos de día 13. Con el fin de evaluar cuáles podían ser las causas de la diferente supervivencia entre embriones de distinto sexo, se procedió a determinar la cantidad relativa de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en embriones en estadio de blastocisto sometidos a estrés térmico *in vitro* y posteriormente se analizó el sexo de los mismos (experimento 4.2). El diseño de estos dos experimentos está representado en la Fig.4.1.

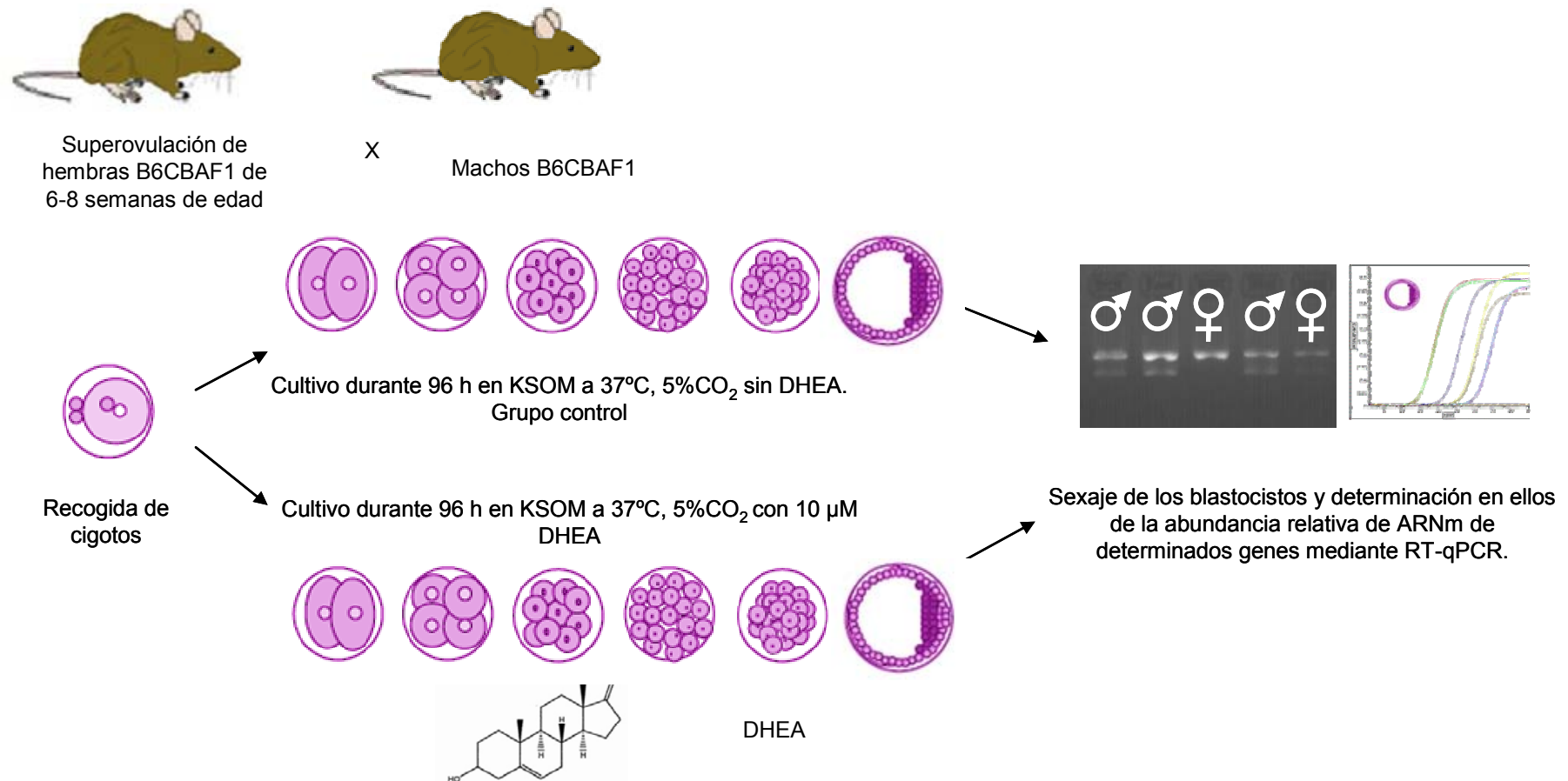
Los siguientes dos experimentos se realizaron sobre embriones cultivados *in vitro* bajo condiciones estándar (37°C, 5%CO<sub>2</sub>), tanto en ausencia como en presencia de DHEA. En el primero de ellos (experimento 4.3), el objetivo fue determinar en blastocistos de distinto sexo la abundancia relativa de ARNm de *G6pdx* y de otros genes importantes (*Sox*, *Bax*, *Na/K*, *Dsc2* y *Oct-4*) en el desarrollo embrionario (Fig.4.5); en el segundo de estos experimentos (experimento 4.4), se persiguió comprobar la velocidad de desarrollo de los embriones de distinto sexo (Fig 4.6).

Por último, en el quinto experimento (experimento 4.5), setenta y dos hembras, en los primeros cuatro días de gestación, fueron sometidas durante diferentes periodos de tiempo a estrés térmico ambiental (35°C, 60% HR). En la Fig 4.7 se representa esquemáticamente el diseño de este experimento y en la Fig 4.8 se muestra los estadios embrionarios afectados en cada momento por el estrés térmico *in vivo*.

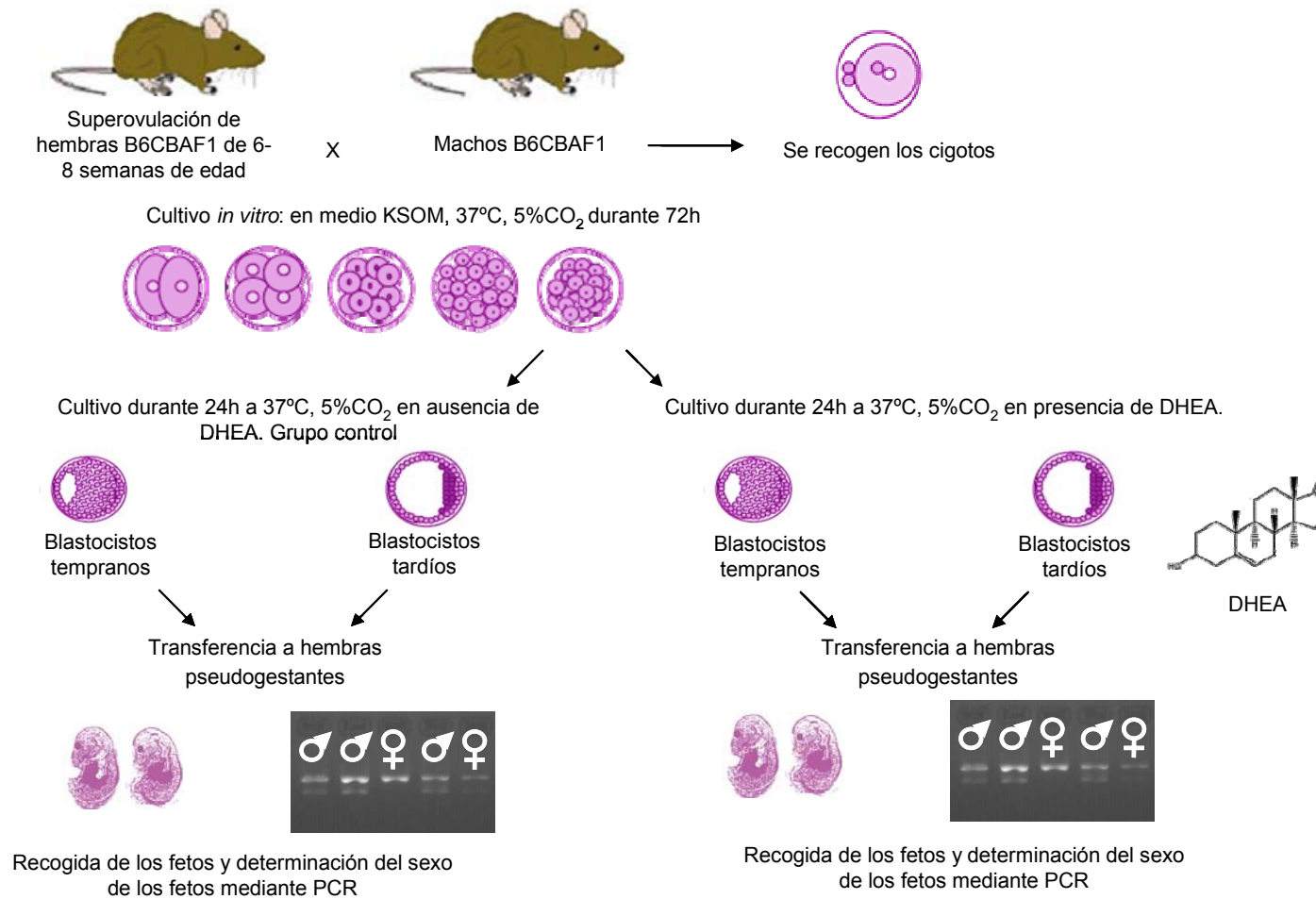




**Fig 4.1.** Representación esquemática de los protocolos correspondientes a los experimentos 4.1 y 4.2. Por una parte, evaluamos el efecto del estrés térmico *in vitro* y por otra realizamos la cuantificación de la concentración relativa de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en presencia o ausencia de DHEA.

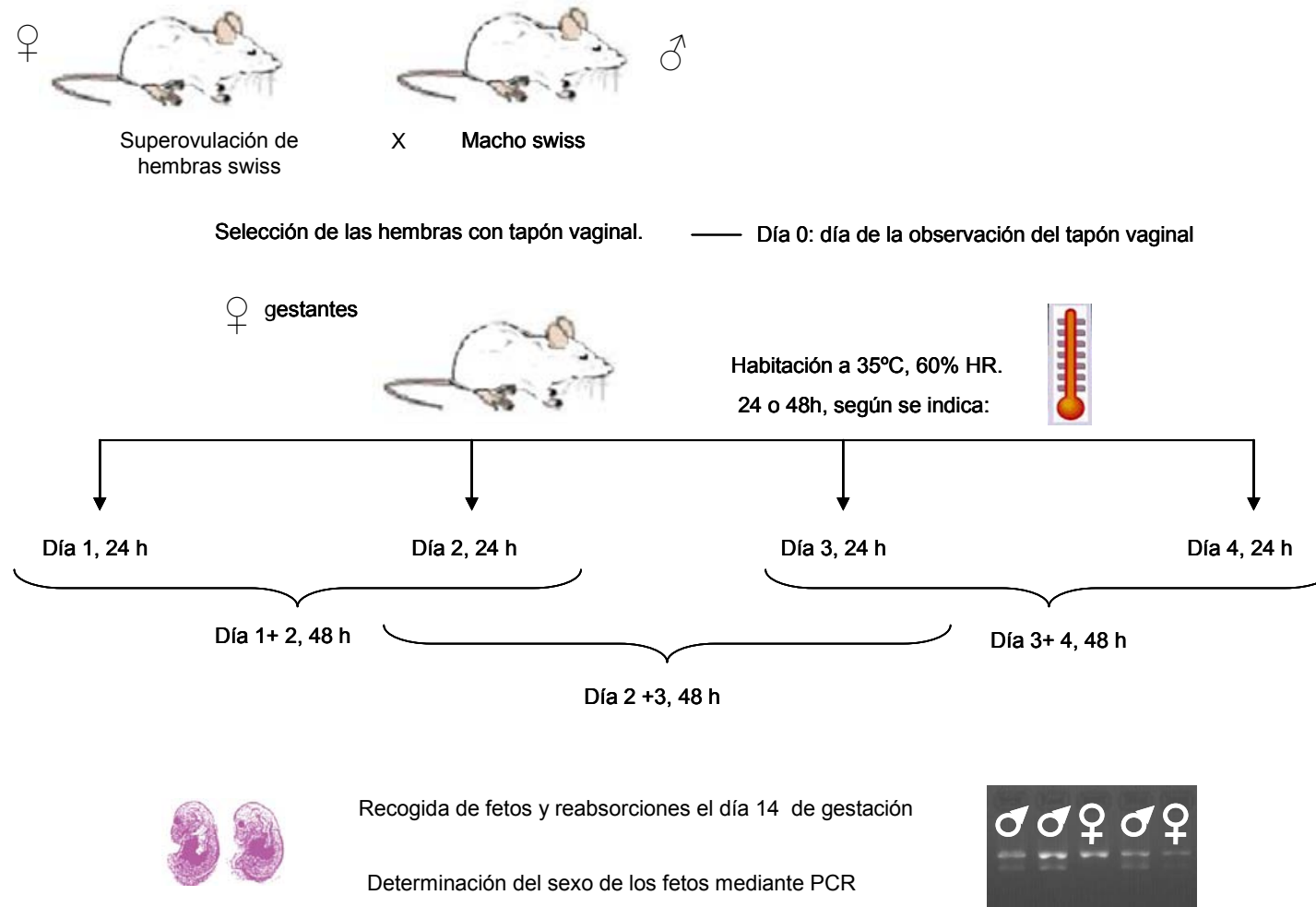


**Fig 4.2.** Representación esquemática del protocolo correspondiente al experimento 4.3. en el que se determinó la abundancia relativa de ARNm de algunos genes importantes en el desarrollo de los embriones de distinto sexo cultivados *in vitro* en ausencia o en presencia de DHEA.

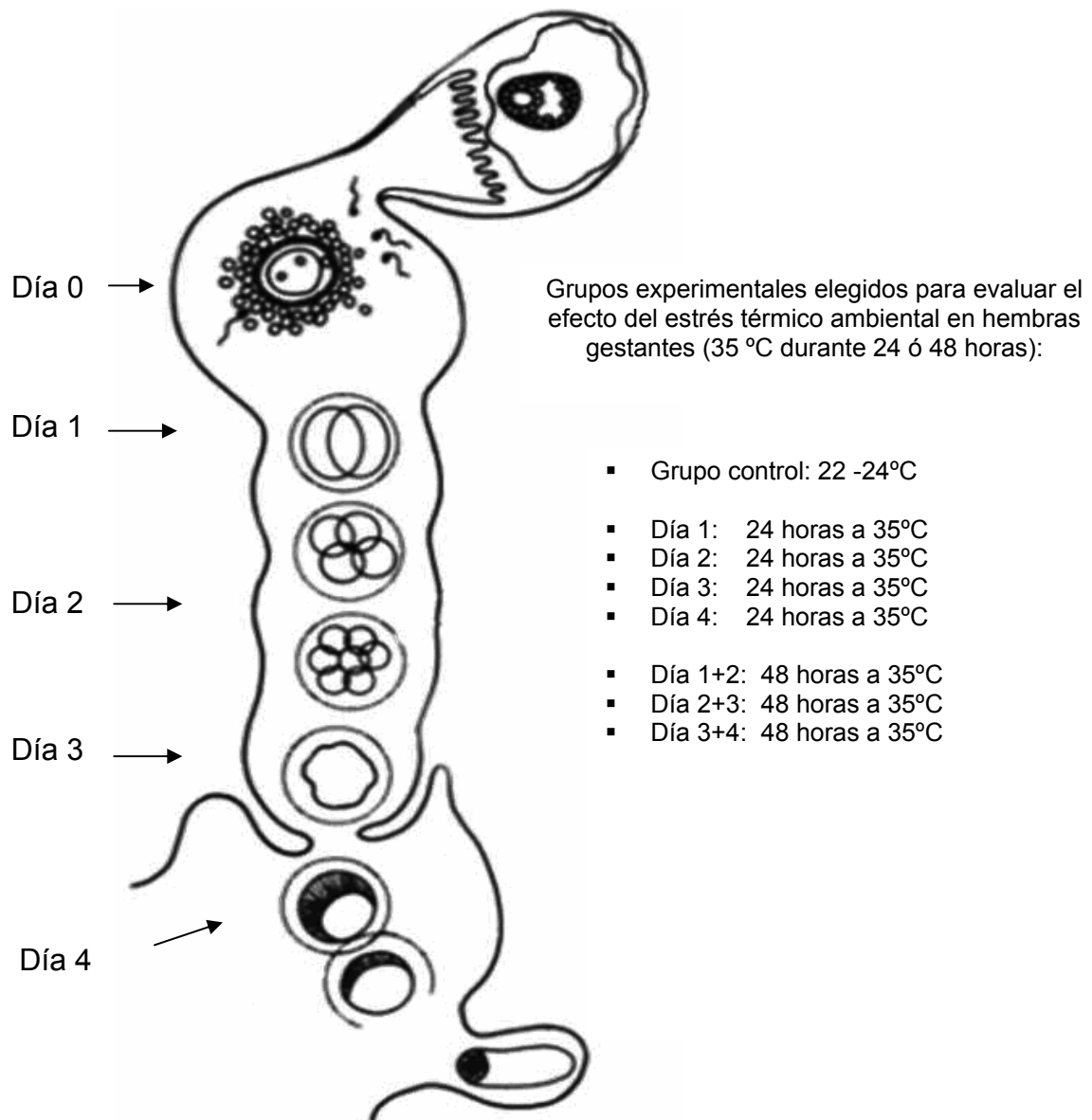


**Fig 4.3.** Representación esquemática del protocolo correspondiente al experimento 4.4 en el que observamos la velocidad de desarrollo de los embriones de distinto sexo cultivados *in vitro* y se determinó el efecto de DHEA sobre la velocidad de desarrollo de los embriones en estadio de mórula.





**Fig 4.4.** Representación esquemática del protocolo correspondiente al experimento 4.5. en el que se valoró el efecto del estrés térmico *in vivo* sobre los primeros estadios del desarrollo embrionario.



**Fig 4.5.** Representación esquemática de los estadios del desarrollo preimplantacional en los que se encontraba el embrión en los diferentes momentos en que las hembras gestantes fueron sometidas a estrés térmico ambiental (día 0, día 1, día 2, día 3 y día 4) (Modificado de Hogan *et al.* 1994)



# Differential Sensitivity of Male and Female Mouse Embryos to Oxidative Induced Heat-Stress is Mediated by Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Gene Expression

M. PÉREZ-CRESPO,<sup>1</sup> M.A. RAMÍREZ,<sup>1</sup> R. FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ,<sup>1</sup> D. RIZOS,<sup>1</sup>  
P. LONERGAN,<sup>2</sup> B. PINTADO,<sup>1</sup> AND A. GUTIÉRREZ-ADÁN<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Dpto. de Reproducción Animal y Conservación de Recursos Zoogenéticos, INIA, Madrid, Spain

<sup>2</sup>Department of Animal Science, University College Dublin, Lyons Research Farm, Newcastle, County Dublin, Ireland

**ABSTRACT** During the preimplantation period, in vitro cultured males have a higher metabolic rate, different gene expression, and grow faster than females. It has been suggested that under some stress conditions male embryos are more vulnerable than females; however, the biological fragility of male embryos is little understood. Since many forms of stress result in the overproduction of cellular reactive oxygen species (ROS), we addressed the hypothesis that the connection between female advantage during early developmental stages and heat stress involves ROS and differential gene expression of G6PD, an X-linked gene related to oxidative stress. We have found that after compaction, female heat-stressed embryos have less relative amounts of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> than males, and female embryos survive better than males under in vivo or in vitro heat stress situations. In addition, in vitro produced female embryos grow slower than male embryos, have differential mRNA transcription of G6PD and also of some genes situated on autosomal-chromosomes (Sox, Bax, and Oct-4). Moreover, by inhibiting G6PD, all differences generated by oxidative stress between male and female embryos disappear. For the first time, we provide an experimental demonstration of a mechanism that explains why following exposure to heat stress-induced ROS, female preimplantation embryos are more resistant than males. *Mol. Reprod. Dev.* 72: 502–510, 2005. © 2005 Wiley-Liss, Inc.

**Key Words:** G6PD; preimplantation; sex differences; developmental speed; sex ratio

limited to IVC and may be a consequence of specific stress conditions experienced in vivo, such as maternal diet that may disrupt development in a gender-specific manner (Kwong et al., 2000). A complex of different mechanisms (gene expression, epigenetic, metabolic, etc) may operate to relate preimplantation embryo environment with future health (Fleming et al., 2004). Moreover, during the preimplantation period, in vitro produced male embryos show a higher metabolic rate and grow faster than female embryos. It has been reported that total glucose metabolism is twice as high in male compared to female embryos, and the activity of the pentose phosphate pathway (PPP) is four times greater in female than in male blastocysts (Tiffin et al., 1991). In addition, micromanipulated male human embryos grow faster than females (Dumoulin et al., 2005). Differential metabolism and growth rates may be attributable to the unbalanced expression of X-linked genes between the sexes during some stages of the early preimplantation development, where both X chromosomes may be active (Epstein et al., 1978; Mak et al., 2004; Okamoto et al., 2004).

We have shown that the mRNA relative abundance of three X-linked genes, two important components of energetic metabolism, also involved in controlling the amount of oxygen radicals (glucose 6-phosphate dehydrogenase-G6PD- and hypoxanthine phosphoribosyl transferase-HPRT) and the X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP), a mammalian protein that controls apoptosis through modulation of caspase activation and activity, are expressed at higher levels in female bovine embryos than in male embryos at the early blastocyst stage (Gutierrez-Adan et al., 2000; Jimenez et al., 2003).

## INTRODUCTION

Preimplantation embryos are susceptible to environmental conditions that may affect their future growth and developmental potential (Fernandez-Gonzalez et al., 2004). In ruminants, an example of embryo sensitivity is manifested in the large offspring syndrome induced by in vitro culture (IVC) (Thompson et al., 1995). However, abnormalities in developmental potential arising from preimplantation environment are not

Grant sponsor: Spanish Ministry of Science and Technology; Grant number: OT02-008 and AGL2003-05783.

\*Correspondence to: A. Gutiérrez-Adán, INIA, Dpto Reproduccion Animal, Carretera de la Coruña km 5.9, 28040 Madrid, Spain.

E-mail: agutierr@inia.es

Received 27 October 2004; Accepted 8 July 2005

Published online 7 September 2005 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

DOI 10.1002/mrd.20366

This differential expression has also been confirmed in human and bovine embryos (Taylor et al., 2001; Wrenzycki et al., 2002). As a critical modulator of intracellular redox potential, NADPH is the principal source of reducing power in numerous critical processes, including defense against oxidative stress. NADPH is generated by a variety of reactions; a major part of the NADPH requirement is met by the oxidation of glucose 6-phosphate to ribose 5-phosphate and CO<sub>2</sub> in the PPP. It has been demonstrated that embryonic cells are able to increase speed and intensity of the PPP in response to oxidants (Filosa et al., 2003). The first and key PPP regulatory enzyme is G6PD, which has been generally considered essential for providing NADPH-reducing power. Under non-stress conditions, there are several reactions providing NADPH to the cell, whereas G6PD is the only NADPH-producing enzyme activated in response to oxidative stress; for this reason, this enzyme may be considered guardian of the cell redox potential (Filosa et al., 2003).

It has been suggested that under some stress conditions male embryos are more vulnerable than females; however, the biological fragility of male embryos is little understood. We have hypothesized (Gutierrez-Adan et al., 2000) that sexually dimorphic gene expression, such as that observed for G6PD, may provide a means of controlling sex ratio in wild animal populations, by favoring the survival of female embryos under oxidative stress conditions. Induction of oxidative stress and apoptosis at the pre-implantation stages may be the reason for the distortion of sex ratio occurring following the exposure to various toxic and stress-inducing agents (James, 1998). Assuming that X-linked factors involved in oxidative stress are expressed at different levels in both sexes, then external or physiologic factors of the pregnant female could influence the concentration of toxins or energy metabolites in the oviduct, favoring embryos of one sex. Because a variety of forms of stress result in the overproduction of cellular reactive oxygen species (ROS), we addressed the hypothesis that the connection between female survival advantage at the blastocyst stage and oxidative induced heat stress, involves ROS and differential gene expression of the X-linked gene G6PD. We then analyzed the redox potential and gender differences of heat-stressed embryos and the mRNA transcription levels of G6PD and some developmental important genes in the context of normal *in vitro* growth conditions or in the presence of dehydroepiandrosterone (DHEA), a potent G6PD inhibitor.

## MATERIALS AND METHODS

### Collection of Mouse Embryos, *In Vitro* Culture, Embryo Transfer and Mouse Sexing Procedure

Six to eight-week-old B6CBAF1 hybrid female mice, housed at 24°C and 60% relative humidity, were superovulated by i.p. injection of 7.5 IU of PMSG and 7.5 IU of hCG given 48 hr apart, and mated with males of the same strain (Jimenez et al., 2003). One-cell stage embryos were recovered and cultured at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>

and 20% O<sub>2</sub> for 72 hr until the morulae stage in K+-modified simplex optimized medium (KSOM), then morulae were cultured for 24 hr in either KSOM at 37°C or 41°C, with or without 10 µM of DHEA (Sigma, St Louis, MO). Embryos that reached the blastocyst stage were transferred into 0.5-day CD1 pseudopregnant females (~12 embryos per recipient) or were frozen until sexing by PCR or until mRNA purification and gene transcription analysis by Real Time PCR. Sexing of blastocysts was performed by nested-PCR amplification of ZFX-ZFY locus (Gutierrez-Adan et al., 1995). The sex of fetuses at Day 14 was determined by the differential Smcx/Smcy band pattern observed after amplification by PCR with the SMCXY-F: 5'-CCGCTGCCAAATTCTTTGG-3' and SMCXY-R: 5'-TGAAGCTTTTGGCTTTGAG-3' primers (Jimenez et al., 2003). All animal experiments were performed in accordance with Institutional Animal Care and USE Committee guidelines and in adherence with guidelines established in the Guide for Care and Use of Laboratory Animals as adopted and promulgated by the Society for the Study of Reproduction.

### *In Vivo* Effect of Heat Stress in Early Developmental Stage on Sex Ratio of Mice Offspring

Female mice were superovulated as described above, and then, each female was housed with a male. Females with a vaginal plug were exposed to a temperature of 35°C with 60% relative humidity for 24hr (at Day 1, 2, 3, or 4; 2 cells, 4–8 cells, morulae, or blastocysts stages, respectively) or for 48hr (at Day 1+2, Day 2+3, or Day 3+4) (day 0 = vaginal plug). Mice in the heat-stress and control groups were killed by cervical dislocation on Day 14, and fetuses were recovered and sexed by PCR as previously described. Rectal temperature of mice was measured inside the 35°C room with a thermocouple connect to a MLT1404 rectal probe for mice (ADI Instruments, Spechbazz, Germany). Temperature was monitored for each animal 2 hr after the onset of heat stress.

### Measurement of Reactive Oxygen Species

Morulae stage embryos were cultured for 24 hr at 37°C or at 41°C in the presence or absence of DHEA. Then, the relative intensity of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration within the embryos was measured using 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCHF<sub>DA</sub>; Molecules Probes, Inc., Eugene, OR). DCHF<sub>DA</sub> is membrane permeant and therefore, is able to diffuse readily into cells. Within the cell, acetate groups are hydrolyzed by intracellular esterase forming 2',7'-dichlorodihydrofluorescein (DCHF), which is polar and thus, trapped within the cell. DCHF then fluoresces when it is oxidized by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to yield 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF). For this reason, the level of 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF) produced within the cells is related to the concentration of peroxide present and thus, its fluorescent emission provides a measure of the cellular peroxide level (Ozawa et al., 2002). Embryos were incubated for 15 min in KSOM containing DCHF<sub>DA</sub>,

and then rinsed in fresh KSOM before being placed on a glass slide and covered with a cover slip. Quantification of DCHFDA was carried out by measuring the level of fluorescence under an inverted fluorescent microscope. Images were processed and analyzed using the plug-in of Image Processing Tool Kit 5.0 (Reindeer Games Inc., Asheville, NC). After quantification, embryos were sexed by PCR (Gutierrez-Adan et al., 1995).

### Transcript Quantification in Sexed Mice Embryos

One-cell mouse embryos were cultured for 96 hr in KSOM without (control group) or with 10  $\mu$ M DHEA (DHEA group). Eighty-eight blastocysts obtained in control conditions (43 females and 45 males) and 74 (36 females and 38 males) obtained with DHEA, were used for sexing and mRNA quantification. Blastocysts were biopsied, following which they were directly frozen in LN<sub>2</sub> in a minimum volume (5  $\mu$ l or less), and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until RNA purification and RT-PCR assay. After sex determination of biopsies (Gutierrez-Adan et al., 1995), mRNA was prepared from four groups of 9–11 pooled male or female embryos following the manufacturer's instructions using the Dynabeads mRNA Direct KIT (DYNAL) (Fernandez-Gonzalez et al., 2004). Four groups of male and female embryos were used for the quantification of every transcript, and three replicate PCR experiments were conducted for all genes analyzed. The reverse transcription (RT) reaction was carried out following the manufacturer's instructions (Gibco-BRL, Grand Island, NY).

The quantification of all gene transcripts was carried out by real time quantitative RT-PCR in three replicates on a Rotorgene 2000 Real Time Cycler<sup>TM</sup> (Corbett Research, Sydney, Australia) with SYBR Green (Molecular Probes, Eugene, OR). The PCR reaction mixture and PCR protocols have already been described (Fernandez-Gonzalez et al., 2004). The quantification was normalized to the endogenous control Histone H2az, since this histone contains introns that allow differentiation of DNA contamination in the RT-PCR. Relative mRNA abundance was determined using the

comparative CT method (Rizos et al., 2002). As negative controls, tubes were always prepared in which RNA or reverse transcriptase was omitted during the RT-reaction. In addition, amplicon identities were confirmed by appropriate restriction digests of PCR products (data not shown). Primer sequences, annealing temperature, the sizes of the amplified fragments, and the Gene Bank accession numbers are shown in Table 1.

### Effect of Dehydroepiandrosterone (DHEA) in the Speed of Development of Male and Female Mouse Embryos

One-cell stage embryos, collected as indicated above, were cultured in KSOM for 96 hr until morulae stage, at  $37^{\circ}\text{C}$  under an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> and 20% O<sub>2</sub>. Then morulae were split in two groups and cultured for further 24 hr until blastocyst stage, in KSOM in the presence or absence of 10  $\mu$ M of DHEA. Early blastocyst and expanded blastocysts were recovered and sexed as indicated above. Four replicates were used.

### Statistical Analysis

Data were analyzed using the SigmaStat (Jandel Scientific, San Rafael, CA) software package. One-way repeated-measures ANOVA (followed by multiple pairwise comparisons using Student-Newman-Kleus method) were used for the analysis of differences in mRNA expression assayed by quantitative RT-PCR, and for the analysis of embryos implanted and reabsorptions obtained in the maternal heat experiment. Data on measurement of reactive oxygen species in embryos, and on effect of heat and DHEA on the sex ratio and sexual dimorphic behavior of mouse fetuses at day 14 were analyzed using Chi-square analysis. A z-test was used to compare the sex ratio (%) obtained in the maternal heat experiment.

## RESULTS

### Differential Effect of Heat Stress in Male and Female Embryos at the Morulae Stage

To analyze the biological differences between male and female embryos and how they respond to heat

TABLE 1. Details of Primers Used for RT-PCR

Gene	Primer	Sequence (5'-3')	Fragment size (bp)	Annealing temperature ( $^{\circ}\text{C}$ )	Gene bank accession no.
Histone H2az	5'	TGTGTACAGCGCAGCCATCCTG	208	58	BC032524
	3'	CTTCCCGATCAGCGATTGTGG			
SOX	5'	TCAGCGAGATTACCATCACAG	135	56	U94700.1
	3'	CGCAAGTTCACCCAGTGTCC			
BAX	5'	AAGCTGAGCGAGTGTCTCCGGCG	361	59	MN 07527
	3'	GCCACAAAGATGGTCACTGTCTGCC			
G6PD	5'	TTGCAGCAGCTGTCTCTATGTG	220	59	NM 008062
	3'	GCCAGGCTTCTTGGTCATCATC			
Na/K	5'	ACCTGTTGGGCATCCGAGAGAC	333	59	BC34177.1
	3'	GGGAAGGCACAGAACCACCA			
DcII	5'	CGGATGACAACCAGAAGCTTGC	310	56	NM_013505
	3'	TGCAGACCGAGATAGGAGAGGG			
Oct-4	5'	GGCGTTCTCTTTGGAAAGGTGTTT	312	60	NM_013633
	3'	CTCGAACCATCTCTCTCT			

**TABLE 2. Effect of Heat Stress (24 hr culture at 41°C) With or Without Dehydroepiandrosterone (DHEA) on the Sex Ratio of Day 14 Murine Fetuses**

Treatment	Morulae in culture	Blastocysts (% developed from morulae)	Blastocysts transferred (female recipient)	Fetus male/female (% implantation rate)	Males %
Control	184	171 (93 <sup>a</sup> )	162 (7)	45/37 (51 <sup>a</sup> )	54.9 <sup>a</sup>
41°C	366	234 (63.9 <sup>b</sup> )	225 (9)	11/28 (17 <sup>b</sup> )	28.2 <sup>b</sup>
41°C + DHEA	322	198 (61.5 <sup>b</sup> )	184 (9)	21/24 (24 <sup>b</sup> )	46.7 <sup>a,b</sup>

Morulae were cultured for 24 hr at 41°C with or without DHEA. The sex of the fetuses at day 14 was determined by PCR.

<sup>a,b</sup>Significantly different in the same column ( $P < 0.01$ ).

stress, we cultured murine embryos in vitro to the morulae stage at 37°C and then exposed them to a temperature of 41°C for 24 hr. The vast majority of control morulae progressed to blastocysts at 37°C, while in the experimental group, exposed to 41°C, only 64% of the morulae (234 of 366) gave rise to blastocysts (Table 2). The sex ratio of blastocysts produced at 37 or 41°C was not different from the expected 1:1. However, after blastocyst transfer to recipients, in our experimental group only 28% male embryos were obtained at Day 14 (11 out of 39 implanted fetuses). Such sex deviation was not seen in the control group (55% male, 45 out of 82 implanted fetuses).

#### Differential Effect of Maternal Heat Stress on Male and Female Embryonic Development

Female mice were heat-stressed using a room temperature of 35°C and 60% relative humidity. These conditions produce a rectal temperature of 39.6°C (Ozawa et al., 2002). The control group was housed at 25°C providing a rectal temperature of 37.7°C in these conditions. Such maternal heat stress induced at Day 1 or 2 did not produce any effect on the sex ratio of the fetuses, whereas heat stress at Day 3 or 4 induced a significant reduction of sex ratio ( $P < 0.05$ ) (Fig. 1). Heat stress decreased the number of implanted embryos compared to control females in the groups of heat treatment at Day 1+2 and 3+4 (Table 3); however, when percentage of reabsorptions was studied (Table 3), reabsorptions were higher in the three groups exposed

to 48 hr heat stress, compared to 24 hr, except when the effect took place on Day 3, in which case the reabsorption percentage equaled that observed after 48 hr of maternal heat exposure. Since no differences in reabsorption numbers were observed between the groups with heat stress at Day 1 and 2, versus at Day 3 and 4 even though sex ratio was clearly affected (Fig. 1), loss of male embryos took place either before implantation or during the early days of implantation (early reabsorptions could not be recognized at Day 14 when females were sacrificed).

#### Effect of the Inhibition of G6PD on Production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on Male and Female Embryos

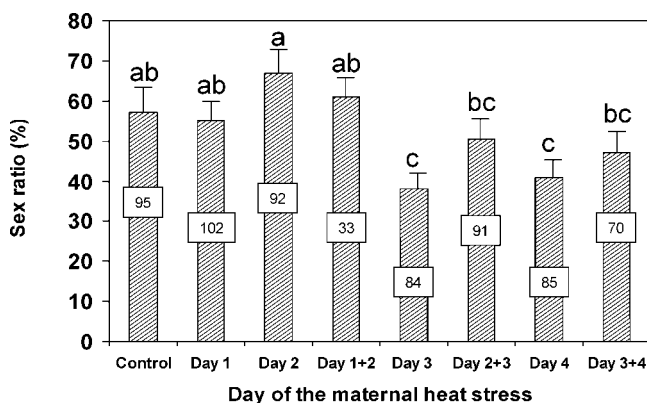
In order to analyze if male and female embryos have different H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations under heat stress conditions of high oxygen tension, we used the 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCHFDA) assay. We observed an overall significant effect ( $P < 0.05$ ) of heat stress on the production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. In addition, the relative fluorescent intensity of DCF was higher in male than in female murine blastocysts under heat stress conditions, indicating that the relative concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is higher in males; in the absence of stress this sex-effect was not as significant (Fig. 2). However, when embryos were cultured in the presence of DHEA such gender differences produced under heat stress disappeared and both sexes had similar amounts of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at the blastocyst stage.

#### Effect of the Inhibition of G6PD on Developmental Speed of Male and Female Embryos and Heat Stress Sensitivity

Under standard conditions, after 96 hr of in vitro culture, faster developing embryos (expanded blastocysts) were predominantly males (75% males), and slower developing embryos (early blastocysts) were predominantly females (38% males). However, in the presence of DHEA these gender-related differences in developmental speed disappeared (Table 4). In addition, when embryos were cultured in the presence of DHEA and exposed to heat stress, no difference was observed between male and female embryo survival (Table 2).

#### Effect of the Inhibition of G6PD on the Transcription of Autosomal Genes in Male and Female Mouse Embryos

In order to analyze if the early differences reported between male and female embryos cultured in vitro



**Fig. 1.** Effect of 24 hr of maternal heat stress at Day 1, 2, 3, and 4, or 48 hr of heat stress at Day 1+2, 2+3, and 3+4, on the sex ratio (percentage of males) of mice fetuses at Day 14 of development. Numbers in the column indicate the number of fetus in each group. **a,b,c:** significantly different between column ( $P < 0.5$ ).

**TABLE 3. In Vivo Developmental Competence of Embryos After Maternal Heat Exposure During 24 hr or 48 hr**

Heat treatment	Females with embryos/mated	# implanted embryos	Mean of implanted embryos	# of resorption (% of resorption)
Control	5/7	97	19.4 <sup>a</sup>	6 (5.9) <sup>a</sup>
Day 1	6/10	112	18.6 <sup>a</sup>	10 (8.9) <sup>a</sup>
Day 2	6/9	103	17.2 <sup>a</sup>	11 (10.7) <sup>a,b</sup>
Day 1+2	4/7	49	12.2 <sup>b</sup>	16 (32.6) <sup>c</sup>
Day 3	7/10	104	14.8 <sup>a,b</sup>	20 (19.2) <sup>b,c</sup>
Day 2+3	7/9	113	16 <sup>a,b</sup>	22 (19.5) <sup>b,c</sup>
Day 4	7/10	97	13.9 <sup>a,b</sup>	12 (12.4) <sup>a</sup>
Day 3+4	7/10	87	12.4 <sup>b</sup>	17 (19.5) <sup>b,c</sup>

<sup>a,b,c</sup>Significantly different in the same column ( $P < 0.05$ ).

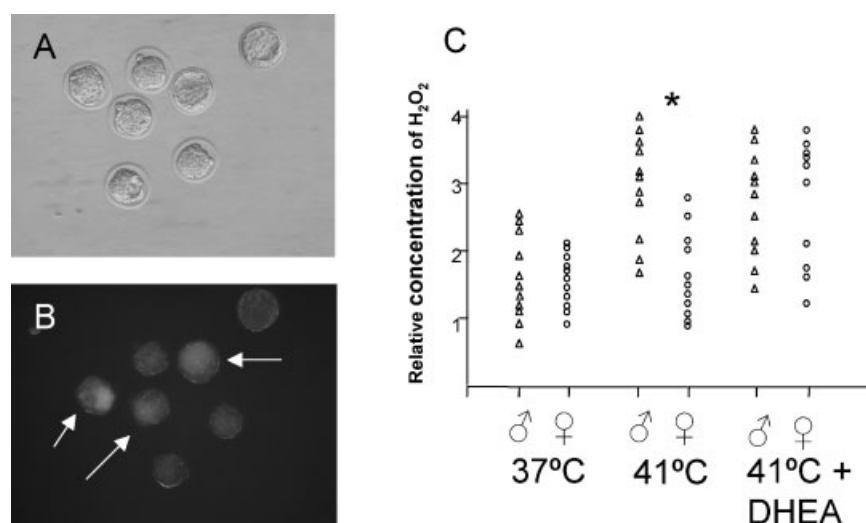
could result from sex-related differential gene expression, mRNA transcription of G6PD and some autosomal genes in male and female embryos were quantified. The relative abundance of sex-specific mRNA was investigated for genes implicated in resistance to apoptosis (BAX), response to stress (sarcosine oxidase-Sox-), compaction (Na/K ATPase-Na/K- and desmocollin II-Dc II-), and related to pluripotency (Oct-4). Our real time PCR quantification analysis confirmed our suspicion that male and female embryos differentially express some of the analyzed target genes. In female embryos, a significantly higher expression of G6PD was observed, whereas Sox, Bax, and Oct-4 were up-regulated genes in male embryos (Fig. 3A). When embryos were cultured in the presence of DHEA, no differences were observed in the relative mRNA levels of the analyzed genes (Fig. 3B).

## DISCUSSION

Maternal heat stress enhances the oxidative stress of the embryo and the production of ROS, which react with lipids, proteins, or nucleic acids in cells, resulting in cellular injury (Wells et al., 1997). Heat stress increases

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration in mice and bovine embryos (Yang et al., 1998; Ozawa et al., 2002; Sakatani et al., 2004), which has been associated with apoptosis (Arechiga et al., 1995; Kochhar et al., 2003). Maternal heat stress could shift the redox status of the oviduct towards oxidation, thus enhancing oxidative stress on the embryos (Ozawa et al., 2004), and in addition, the sex ratio of heat-stressed bovine embryos was also skewed in favor of females (Kochhar et al., 2003). In this study, we have found that heat stress is stage-dependent (morulae and blastocysts are less sensitive to high temperature than previous developmental stages) and can differentially affect male and female embryos. The inhibition of G6PD, the only NADPH-producing enzyme activated in response to oxidative stress (Filosa et al., 2003), negates the differences generated by oxidative stress between male and female embryos; for this reason under heat stress-induced ROS, female preimplantation embryos are more resistant than males.

Within the last few years, several reports have demonstrated gender-related differential expression of a number of genes. These differences are present at least



**Fig. 2.** Fluorescent images of Day 4 mouse embryos, cultured for 24 hr at 41°C (A, B). Fluorescence intensity due to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is similar in male and female embryos cultured at 37°C (C), but for the embryos cultured at 41°C (B) males (arrow) have higher fluorescence intensity than females, indicating a higher H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> level. C: Scoring data illustrate

the amount of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> measured by DCHFDA, produced for male and female morulae cultured for 24 hr at 37°C, 41°C, and 41°C in the presence of DCHFDA. An asterisk (\*) indicates a significant difference between male and female (Chi-square analysis,  $P < 0.05$ ).



**TABLE 4. Effect of Dehydroepiandrosterone (DHEA) in the Sexual Dimorphic Behavior (Speed of Development) of Mouse Embryos**

Treatment	Morulae in culture	Blastocysts (% of development)	Blastocysts transferred	Fetus male/ female	Males %
KSOM w/o DHEA					
Expanded blastocyst	387	379 (97)	192	21/7	75 <sup>a</sup>
Early blastocyst			187	14/24	38 <sup>b</sup>
KSOM w DHEA					
Expanded blastocyst	420	390 (92)	193	20/21	49 <sup>b</sup>
Early blastocyst			197	47/50	48 <sup>b</sup>

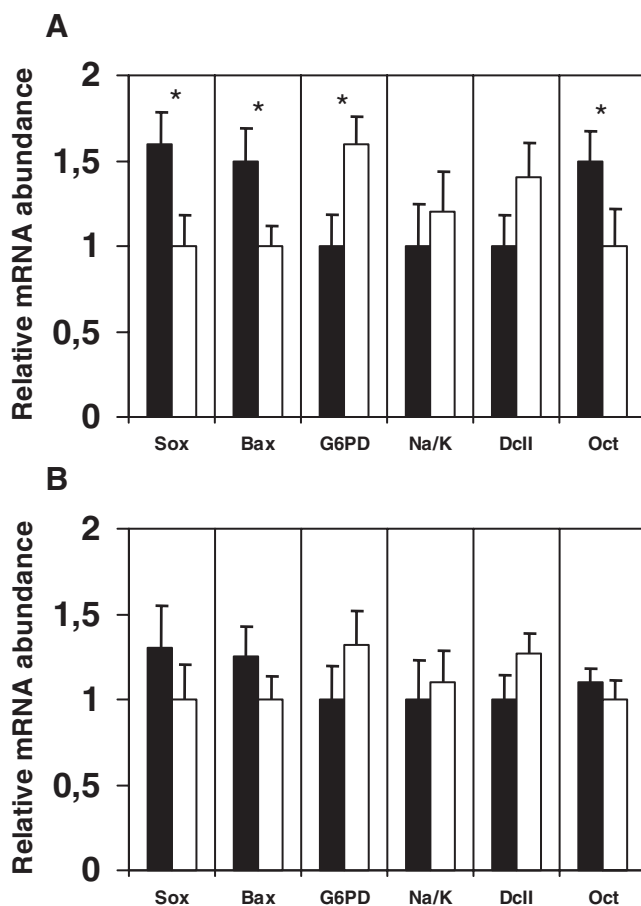
<sup>a,b</sup>Significantly different in the same column ( $P < 0.05$ ).

in bovine (Gutierrez-Adan et al., 2000), human (Taylor et al., 2001), and murine (Latham et al., 2000) embryos, and they not only affect sex chromosomes-linked genes like G6PD (Iwata et al., 2002) or Xiap, but also genes located on autosomes such as interferon-tau (Larson et al., 2001). In this report, we demonstrate that under our in vitro conditions (that are probably more stressful than in vivo) some mRNAs of autosomal genes are more

abundant in female than in male mice blastocysts. Oct-4, a redox modulated transcription regulator required to maintain the totipotentially of embryonic stem cells (Guo et al., 2004), was highly expressed in males, which may explain the tendency for a higher success in obtaining embryonic stem cells from male blastocysts (Auerbach et al., 2000). Also, the higher Bax and Sox mRNA transcription we have detected in male embryos, may indicate a compensating protection to heat stress is more critical for male than female embryos. The differences in mRNA transcription of these genes between genders may implicate a new epigenetic process occurring in early embryos regulated by G6PD and with implications in sex ratio. Recently, three new epigenetic processes have been discovered; first that telomeres on early male embryo Xqs are around 1,100 bp shorter than in female Xqs (Perner et al., 2003); second, that there are gender-dependent changes in the CAG repeat length (responsible for Huntington's disease) that arise in early embryos (Kovtun et al., 2004) indicating that an X-encoded factor suppresses expansion, or that an X- or Y-linked factor is involved in the gender-linked expression of replication/repair enzymes that play a role at early stages of embryo division; and third, it has been reported that mice XY male fetuses had larger placentae than XX females (Ishikawa et al., 2003) indicating that there are also placental differences between males and females, which may explain sex-differences in implantation.

One possible explanation of the mechanism of this phenomenon we describe is that the differences in transcription of autosomal genes are a consequence of differential transcription of X chromosome genes. Female embryos, at least at the blastocyst stage, possess two active X chromosomes in the ICM and could, therefore, be less susceptible to metabolic imbalance as a result of gene dosage (Gutierrez-Adan et al., 2000; Wrenzycki et al., 2002). Genes that are located on the X-chromosome, such as the one encoding G6PD, the gatekeeper for the pentose-phosphate pathway are, for example, expressed more strongly in female than male morulae and blastocysts (Gutierrez-Adan et al., 2000; Taylor et al., 2001; Iwata et al., 2002; Wrenzycki et al., 2002). The different mRNA relative abundance of some autosomal genes might be due to an indirect outcome of X-chromosome dosage.

In agreement with the higher G6PD mRNA relative abundance detected in female blastocysts, it has been

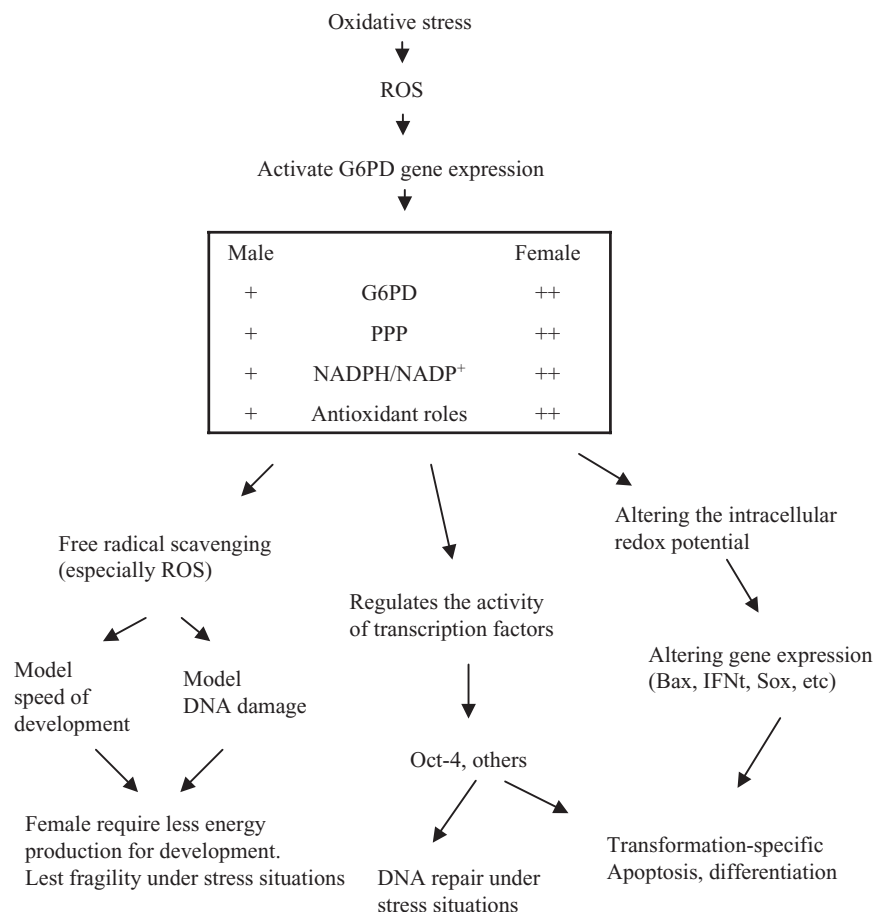


**Fig. 3.** Relative abundance of specific transcripts in male and female murine blastocysts produced in vitro. **A:** Relative transcription quantify by Real Time PCR. Female mice embryos have higher mRNA level of G6PD, while male have higher mRNA level of BAX, Sox, and Oct-4. **B:** Relative transcription of mice blastocyst in vitro culture in presence of DHEA. An asterisk (\*) indicates a significant difference in relative transcript abundance between male (black bars) and female (white bars) embryos (ANOVA analysis;  $P < 0.01$ ).

reported that under stress conditions of high oxygen tension (5% CO<sub>2</sub>, 95% air), the developmental competence of embryos having high G6PD activity was higher than those having low enzyme activity (Iwata et al., 2002), indicating that the activity of this enzyme strongly affects the developmental potential of embryos. G6PD is the first and rate-limiting enzyme of the pentose phosphate pathway, and is important for its role in the regeneration of the reduced form of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH). During cellular oxidative stress, NADPH is critical for maintaining glutathione (GSH) in its reduced form, which is essential for detoxification of reactive free radicals and lipid hydroperoxides (Nicol et al., 2000). G6PD is a developmentally critical cytoprotective enzyme for endogenous and xenobiotic-initiated embryopathic oxidative stress and DNA damage (Nicol et al., 2000). Under non stress conditions, embryonic cells without G6PD are able to maintain a high [NADPH]/[NADP<sup>+</sup>] ratio. However, G6PD is the only NADPH-producing enzyme activated in response to oxidative stress (Filosa et al., 2003) that plays a crucial role in protection from redox-stress-

induced apoptosis (Fico et al., 2004). Also, the fact that G6PD is enhanced by dietary carbohydrates and it is inhibited by dietary polyunsaturated fat (Salati and Amir-Ahmady, 2001) may explain why the sex ratio was very low when mothers were submitted to a high carbohydrate diet regime and was high when mothers were fed a high-fat diet (Rosenfeld et al., 2003).

We have found that the inhibition of the G6PD removed some of the dimorphic differences between early male and female embryos. In agreement with our results, it has been reported that the inhibition of G6PD in bovine embryos eliminates the differences in interferon-tau mRNA expression between males and females (Kimura et al., 2004). This could indicate that other physiological differences are induced by the differential expression of this X chromosome-linked G6PD gene. One possibility is that some of the transcription factors responsible for male/female differences are redox regulated and more active when NADPH is high. The antioxidant roles of NADPH can be considered in terms of radical scavenging and redox regulation (Harvey et al., 2002) (Fig. 4). In terms of free radical scavenging, males



**Fig. 4.** Proposed model to explain how G6PD may modulate the differences in Redox regulation of male/female embryos under oxidative stress. ROS activate G6PD as part of a cellular response against oxidative damage. Due to the differential gene expression between male and female embryos, the activity of the pentose phosphate pathway (PPP) is four times greater in female than in male

blastocysts (5). Females produce more NADPH, which is very important for its role in the detoxification of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The differences between redox regulation of male and female embryos could explain many of the differences observed between genders during these early developmental stages.

have more  $H_2O_2$  than females; under normal circumstances, low doses of  $H_2O_2$  promote higher cell proliferation in males, but under some stress conditions, the high dose of  $H_2O_2$  induces a higher incidence of cell death in males via either apoptosis or necrotic mechanisms (Hansen et al., 1999). It is assumed that shorter intervals between cell divisions increase a cell's vulnerability to toxic insult and thus, the more rapid growth of the male fetus increases susceptibility to lethal changes that will ultimately affect the sex ratio. In terms of redox regulation, altering the redox potential may activate hypoxia inducible factors that mediate oxygen-dependent expression of a range of genes involved in cellular and systemic processes (Harvey et al., 2002).

Maternal conditions and environmental and stressful circumstances affect sex ratio in mammals (James, 1998). In humans, fewer males are conceived in sub-optimal conditions than females. External maternal stress around the time of conception is associated with a reduction in the male to female sex ratio, suggesting that the male embryo is more vulnerable than the female (Hansen et al., 1999). Sex ratio declines as a consequence of environmental pollution, destructive earthquakes, smoking parents, aged mothers, stress caused by ovulation induction procedures, war situations, etc (James, 1998). The data presented here support the hypothesis that a greater attrition of males is exerted in all those situations in which reproductive conditions are sub-optimal. Food restriction in animals also produces female-biased litters (Rivers and Crawford, 1974). In rodents, it has been seen that stresses other than food restriction can also reduce the proportion of males, and that pregnant rodents respond to stress showing a selective prenatal vulnerability of male fetuses as is observed in many mammals, including humans, suggesting that male embryos and fetuses are particularly susceptible to loss (James, 1998; Pergament et al., 2002). In humans, it has been estimated that the primary sex ratio (male/female ratio at the time of fertilization) differs remarkably from the theoretically expected ratio of 1:1, and may be as high as 170 males to 100 females (Hassold et al., 1983; Pergament et al., 2002). Because the secondary sex ratio (or ratio at birth) is approximately 105 in the majority of developed countries, it is clear that preimplantation and prenatal mortality affects sexes differently. The fact that stress favors daughters is consistent with the sex allocation hypothesis of Trivers and Willard (1973); their sex ratio theory predicts that natural selection in mammals should favor an excess of male offspring only when mothers are in good survival conditions, whereas endangered mothers would benefit by producing daughters (Trivers and Willard, 1973); thus, it is conceivable that parents could adjust the sex of their offspring in response to environmental conditions.

Very little is known about the way in which selection acts on sex ratio variation, or on any putative decision rules underlying this variation in natural populations. The extension of sex determination to earlier stages of development (before gonadal formation) harmonizes

eutherian development with marsupial development and may be relevant to temperature-dependent sex ratio variation in reptiles. We suggest a new epigenetic process occurring in early embryos mediated by G6PD and with implications for sex ratio. As adaptive response to the damaging effects of heat stress-induced ROS, female preimplantation embryos are more resistant than males because under oxidative stress conditions, they may express more G6PD as a guardian of the cell redox potential. By studying the differences between male and female embryos, it may be possible to gain further insight into, not only sex ratio distortion, but also aspects of early embryo development, X inactivation, reprogramming of the genome, and epigenetic and genetic process related with early development.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to U. Mittwoch for the critical reading of the manuscript.

## REFERENCES

- Arechiga CF, Ealy AD, Hansen PJ. 1995. Evidence that glutathione is involved in thermotolerance of preimplantation murine embryos. *Biol Reprod* 52:1296–1301.
- Auerbach W, Dunmore JH, Fairchild-Huntress V, Fang Q, Auerbach AB, Huszar D, Joyner AL. 2000. Establishment and chimera analysis of 129/SvEv- and C57BL/6-derived mouse embryonic stem cell lines. *Biotechniques* 29:1024–1028.
- Dumoulin JC, Derhaag JG, Bras M, Van Montfort AP, Kester AD, Evers JL, Geraedts JP, Coonen E. 2005. Growth rate of human preimplantation embryos is sex dependent after ICSI but not after IVF. *Hum Reprod* 20:484–491.
- Epstein CJ, Smith S, Travis B, Tucker G. 1978. Both X chromosomes function before visible X-chromosome inactivation in female mouse embryos. *Nature* 274:500–503.
- Fernandez-Gonzalez R, Moreira P, Bilbao A, Jimenez A, Perez-Crespo M, Ramirez MA, Rodriguez De Fonseca F, Pintado B, Gutierrez-Adan A. 2004. Long-term effect of in vitro culture of mouse embryos with serum on mRNA expression of imprinting genes, development, and behavior. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:5880–5885.
- Fico A, Pagliarunga F, Cigliano L, Abrescia P, Verde P, Martini G, Laccarino I, Filosa S. 2004. Glucose-6-phosphate dehydrogenase plays a crucial role in protection from redox-stress-induced apoptosis. *Cell Death Differ* 11:823–831.
- Filosa S, Fico A, Pagliarunga F, Balestrieri M, Crooke A, Verde P, Abrescia P, Bautista JM, Martini G. 2003. Failure to increase glucose consumption through the pentose-phosphate pathway results in the death of glucose-6-phosphate dehydrogenase gene-deleted mouse embryonic stem cells subjected to oxidative stress. *Biochem J* 370: 935–943.
- Fleming TP, Kwong WY, Porter R, Ursell E, Fesenko I, Wilkins A, Miller DJ, Watkins AJ, Eckert JJ. 2004. The embryo and its future. *Biol Reprod* 71:1046–1054.
- Guo Y, Einhorn L, Kelley M, Hirota K, Yodoi J, Reinbold R, Scholer H, Ramsey H, Hromas R. 2004. Redox regulation of the embryonic stem cell transcription factor oct-4 by thioredoxin. *Stem Cells* 22: 259–264.
- Gutierrez-Adan A, De La Fuente J, Fuentes S, Payasa A, Ugarte C, Pintado B. 1995. Influence of biopsy sexing and in vitro culture on losses of female mouse and bovine embryos. *Anim Biotechnol* 6: 101–109.
- Gutierrez-Adan A, Oter M, Martinez-Madrid B, Pintado B, De La Fuente J. 2000. Differential expression of two genes located on the X chromosome between male and female in vitro-produced bovine embryos at the blastocyst stage. *Mol Reprod Dev* 55:146–151.
- Hansen D, Moller H, Olsen J. 1999. Severe periconceptional life events and the sex ratio in offspring: Follow up study based on five national registers. *Bmj* 319:548–549.

- Harvey AJ, Kind KL, Thompson JG. 2002. REDOX regulation of early embryo development. *Reproduction* 123:479–486.
- Hassold T, Quillen SD, Yamane JA. 1983. Sex ratio in spontaneous abortions. *Ann Hum Genet* 47:39–47.
- Ishikawa H, Rattigan A, Fundele R, Burgoyne PS. 2003. Effects of sex chromosome dosage on placental size in mice. *Biol Reprod* 69:483–488.
- Iwata H, Kimura K, Hashimoto S, Ohta M, Tominaga T, Minami N. 2002. Role of G6PD activity on sex ration and developmental competence under oxidative stress. *J Reprod Dev* 48:447–453.
- James WH. 1998. Hypotheses on mammalian sex ratio variation at birth. *J Theor Biol* 192:113–116.
- Jimenez A, Madrid-Bury N, Fernandez R, Perez-Garnelo S, Moreira P, Pintado B, de la Fuente J, Gutierrez-Adan A. 2003. Hyperglycemia-induced apoptosis affects sex ratio of bovine and murine preimplantation embryos. *Mol Reprod Dev* 65:180–187.
- Kimura K, Spate LD, Green MP, Murphy CN, Seidel GE, Jr., Roberts RM. 2004. Sexual dimorphism in interferon-tau production by in vivo-derived bovine embryos. *Mol Reprod Dev* 67:193–199.
- Kochhar HPS, Lamarre J, King WA. 2003. Effect of interleukin-11 (RHIL-11) on the development, sex ratio and cell number of heat stressed bovine embryos. *Theriogenology* 59:343.
- Kovtun IV, Welch G, Guthrie HD, Hafner KL, McMurray CT. 2004. CAG repeat lengths in X- and Y-bearing sperm indicate that gender bias during transmission of Huntington's disease gene is determined in the embryo. *J Biol Chem* 279:9389–9391.
- Kwong WY, Wild AD, Roberts P, Willis AC, Fleming TP. 2000. Maternal undernutrition during the preimplantation period of rat development causes blastocyst abnormalities and programming of postnatal hypertension. *Development* 127:4195–4202.
- Larson MA, Kimura K, Kubisch HM, Roberts RM. 2001. Sexual dimorphism among bovine embryos in their ability to make the transition to expanded blastocyst and in the expression of the signaling molecule IFN-tau. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:9677–9682.
- Latham KE, Patel B, Bautista FD, Hawes SM. 2000. Effects of X chromosome number and parental origin on X-linked gene expression in preimplantation mouse embryos. *Biol Reprod* 63:64–73.
- Mak W, Nesterova TB, de Napoles M, Appanah R, Yamanaka S, Otte AP, Brockdorff N. 2004. Reactivation of the paternal X chromosome in early mouse embryos. *Science* 303:666–669.
- Nicol CJ, Zielinski J, Tsui LC, Wells PG. 2000. An embryoprotective role for glucose-6-phosphate dehydrogenase in developmental oxidative stress and chemical teratogenesis. *Faseb J* 14:111–127.
- Okamoto I, Otte AP, Allis CD, Reinberg D, Heard E. 2004. Epigenetic dynamics of imprinted X inactivation during early mouse development. *Science* 303:644–649.
- Ozawa M, Hirabayashi M, Kanai Y. 2002. Developmental competence and oxidative state of mouse zygotes heat-stressed maternally or in vitro. *Reproduction* 124:683–689.
- Ozawa M, Matsuzuka T, Hirabayashi M, Kanai Y. 2004. Redox status of the oviduct and Cdc2 activity in 2-cell stage embryos in heat-stressed mice. *Biol Reprod* 71:291–296.
- Pergament E, Todydemir PB, Fiddler M. 2002. Sex ratio: A biological perspective of 'Sex and the City'. *Reprod Biomed Online* 5:43–46.
- Perner S, Bruderlein S, Hasel C, Waibel I, Holdenried A, Ciloglu N, Chopurian H, Nielsen KV, Plesch A, Hogel J, Moller P. 2003. Quantifying telomere lengths of human individual chromosome arms by centromere-calibrated fluorescence in situ hybridization and digital imaging. *Am J Pathol* 163:1751–1756.
- Rivers JP, Crawford MA. 1974. Maternal nutrition and the sex ratio at birth. *Nature* 252:297–298.
- Rizos D, Lonergan P, Boland MP, Arroyo-Garcia R, Pintado B, de la Fuente J, Gutierrez-Adan A. 2002. Analysis of differential messenger RNA expression between bovine blastocysts produced in different culture systems: Implications for blastocyst quality. *Biol Reprod* 66:589–595.
- Rosenfeld CS, Grimm KM, Livingston KA, Brokman AM, Lamberson WE, Roberts RM. 2003. Striking variation in the sex ratio of pups born to mice according to whether maternal diet is high in fat or carbohydrate. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:4628–4632.
- Sakatani M, Kobayashi S, Takahashi M. 2004. Effects of heat shock on in vitro development and intracellular oxidative state of bovine preimplantation embryos. *Mol Reprod Dev* 67:77–82.
- Salati LM, Amir-Ahmady B. 2001. Dietary regulation of expression of glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Annu Rev Nutr* 21:121–140.
- Taylor DM, Handyside AH, Ray PF, Dibb NJ, Winston RM, Ao A. 2001. Quantitative measurement of transcript levels throughout human preimplantation development: Analysis of hypoxanthine phosphoribosyl transferase. *Mol Hum Reprod* 7:147–154.
- Thompson JG, Gardner DK, Pugh PA, McMillan WH, Tervit HR. 1995. Lamb birth weight is affected by culture system utilized during in vitro pre-elongation development of ovine embryos. *Biol Reprod* 53:1385–1391.
- Tiffin GJ, Rieger D, Betteridge KJ, Yadav BR, King WA. 1991. Glucose and glutamine metabolism in pre-attachment cattle embryos in relation to sex and stage of development. *J Reprod Fertil* 93:125–132.
- Trivers RL, Willard DE. 1973. Natural selection of parental ability to vary the sex ratio of offspring. *Science* 179:90–92.
- Wells PG, Kim PM, Laposa RR, Nicol CJ, Parman T, Winn LM. 1997. Oxidative damage in chemical teratogenesis. *Mutat Res* 396:65–78.
- Wrenzycki C, Lucas-Hahn A, Herrmann D, Lemme E, Korsawe K, Niemann H. 2002. In vitro production and nuclear transfer affect dosage compensation of the X-linked gene transcripts G6PD, PGK, and Xist in preimplantation bovine embryos. *Biol Reprod* 66:127–134.
- Yang HW, Hwang KJ, Kwon HC, Kim HS, Choi KW, Oh KS. 1998. Detection of reactive oxygen species (ROS) and apoptosis in human fragmented embryos. *Hum Reprod* 13:998–1002.



**CAPÍTULO II. Efecto del estrés térmico escrotal sobre la viabilidad e integridad del ADN de los espermatozoides murinos y la proporción de sexos de la descendencia**

Scrotal Heat Stress Effects on Sperm Viability, Sperm DNA Integrity and the Offspring Sex Ratio in Mice (2008) *Molecular Reproduction and Development* 75(1): 40-47



### 5.1. Resumen

Diversos autores han señalado el impacto negativo del estrés térmico sobre la fertilidad masculina. Este segundo trabajo se diseñó con el objeto de evaluar los efectos del estrés térmico escrotal sobre las células germinales del testículo y los espermatozoides presentes en el epidídimo. Para ello, el tercio posterior de los animales se introdujo en un baño de agua a una temperatura de 42°C durante 30 minutos. En diferentes momentos después de recibir el tratamiento térmico (6 horas, 7, 14, 21, 28 días), un grupo de animales fue sacrificado, se recogieron los espermatozoides de la cola del epidídimo y del conducto deferente y se evaluaron diferentes parámetros espermáticos tales como: concentración, viabilidad, motilidad basal, motilidad progresiva e integridad del ADN espermático mediante Terminal dUTP Nick-End Labelling (TUNEL). Otro grupo de animales tratados se utilizaron para establecer cruces con hembras en los momentos posteriores al estrés térmico anteriormente señalados. A continuación se analizó el porcentaje de hembras gestantes, la tasa de implantación embrionaria y el sexo de los fetos concebidos por estos machos.

Nuestros resultados indicaron que un tratamiento térmico moderado y por un corto período de tiempo afecta de diferente manera a los distintos tipos de células germinales masculinas presentes en el testículo. Así pues, los espermatocitos presentes en el testículo en el momento del tratamiento dieron lugar, entre 21 y 28 días después, a un menor número de espermatozoides comparados con el grupo control y a un descenso en la viabilidad y motilidad espermática; estos animales eran subfértiles. Los espermatozoides formados a partir de las espermatidas afectadas por el tratamiento mostraron los niveles más elevados de fragmentación del ADN, sin que se viera comprometida la fertilidad de los machos. Cuando se analizaron los espermatozoides presentes en el epidídimo en el momento del estrés térmico, se observó que no existían diferencias respecto a los controles en cuanto a la viabilidad y motilidad espermática, pero sí, un incremento en la fragmentación del ADN espermático, así como una distorsión de la proporción de sexos a favor de las hembras en la descendencia procedente de los machos tratados.

Los resultados obtenidos indicaron que los espermatocitos son las células germinales que tiene una mayor sensibilidad al estrés térmico, y sugieren que los espermatozoides portadores del cromosoma X e Y pueden responder de forma diferencial frente al estrés inducido por calor.





## 5.2. Diseño experimental

Se llevaron acabo tres experimentos, en todos ellos los animales fueron sometidos al estrés térmico escrotal como se detalla a continuación:

Cuarenta machos adultos de la cepa CD1 de 8-12 semanas de edad fueron anestesiados mediante la utilización de Xilacina-Ketamina (0.1ml/10g). El tercio posterior de los machos seleccionados para el estrés térmico se introdujo en un baño a 42°C durante 30 minutos; los machos control también fueron anestesiados.

Los experimentos que se realizaron son los siguientes:

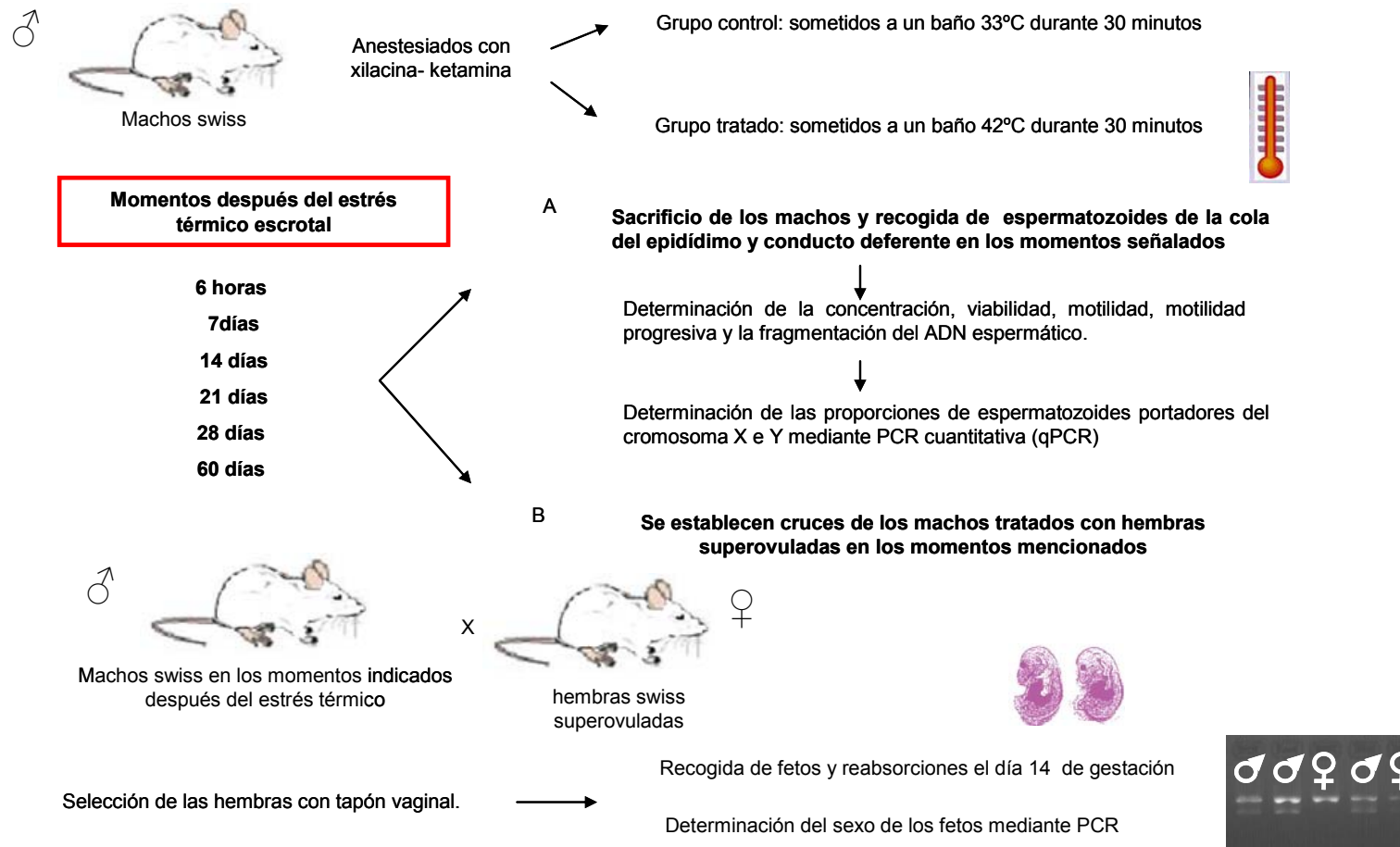
**Experimento 5.1:** Se analizaron las consecuencias del daño inducido por el estrés térmico sobre las células germinales presentes en el testículo y los espermatozoides presentes en el epidídimo.

**Experimento 5.2:** Se examinaron las consecuencias del estrés térmico paterno sobre el desarrollo embrionario y fetal.

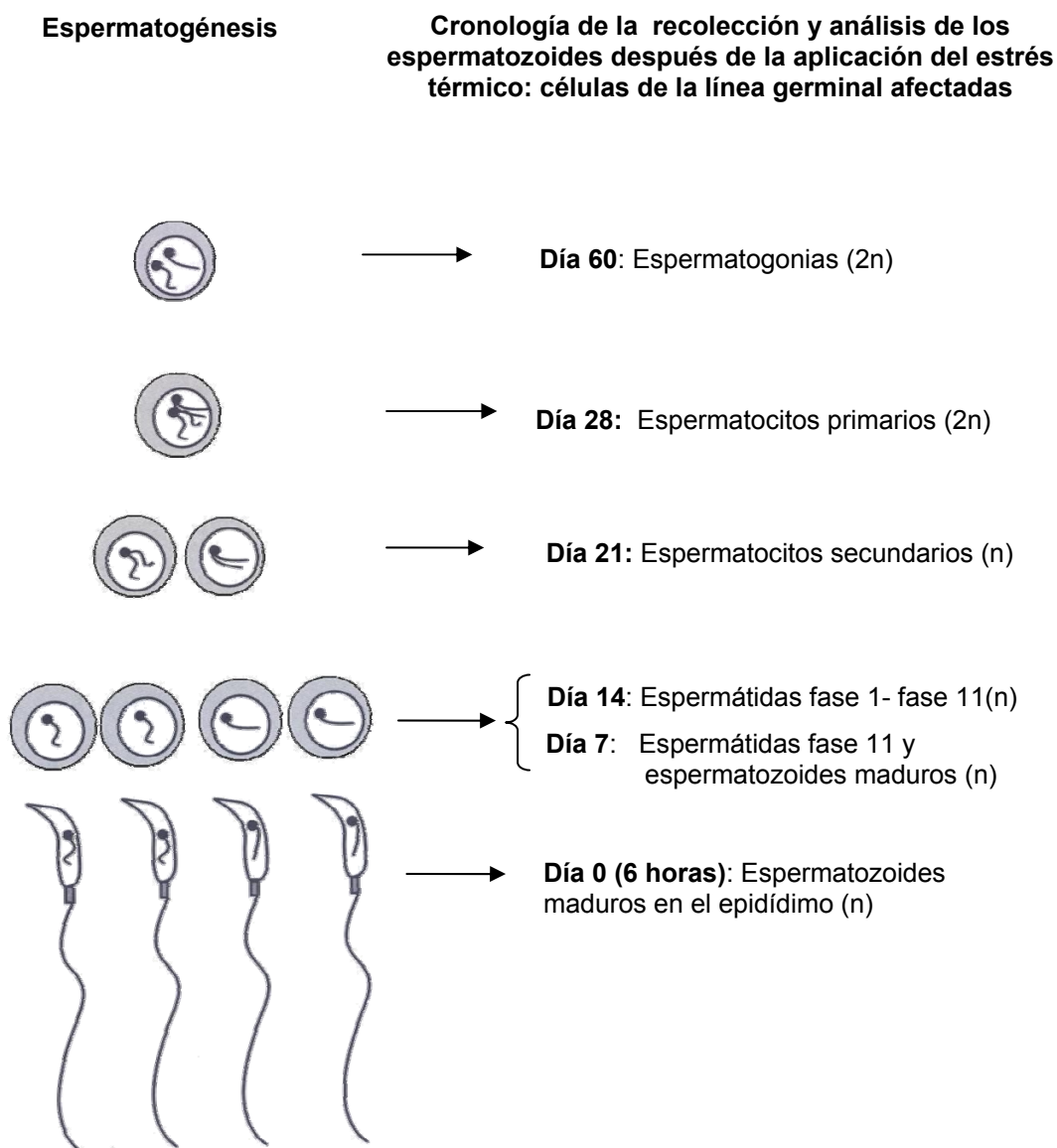
**Experimento 5.3:** Se determinó si el estrés térmico paterno puede influir en la proporción de sexos de la descendencia.

El esquema del diseño de los tres experimentos se representa a continuación (Fig.5.1). En la Fig.5.2, se muestran las células de la línea germinal masculina afectadas por el estrés térmico en relación al momento elegido para analizar los espermatozoides.





**Fig 5.1.** Representación esquemática de los protocolos correspondientes a los experimentos 5.1, 5.2 y 5.3. Por una parte, se evaluó el efecto del estrés térmico escrotal sobre los espermatozoides recogidos en diferentes momentos del tratamiento (A) y, por otra, las consecuencias del tratamiento térmico sobre el desarrollo embrionario y fetal y la proporción de sexos de la descendencia de los cruces establecidos en los citados momentos (B).



**Fig 5.2.** Células de la línea germinal masculina afectadas por el estrés térmico en relación al momento elegido para analizar los espermatozoides basado en la duración de la espermatogénesis murina descrita por Oakberg (1956) y Russell *et al.* (1990). Se muestran los días que transcurren desde el estrés térmico hasta el análisis de los espermatozoides o hasta el establecimiento del cruce y las células de la línea germinal afectadas por el estrés térmico en esos momentos.

# Scrotal Heat Stress Effects on Sperm Viability, Sperm DNA Integrity, and the Offspring Sex Ratio in Mice

M. PÉREZ-CRESPO, B. PINTADO, AND A. GUTIÉRREZ-ADÁN\*

*Dpto. de Reproducción Animal y Conservación de Recursos Zoogenéticos, INIA, Madrid, Spain*

**ABSTRACT** Evidence exists to suggest detrimental effects of heat stress on male fertility. This study was designed to assess the effects of scrotal heat stress on mature and developing sperm in a mouse model. After receiving shock heat treatment (42°C for 30 min), mature spermatozoa were recovered from the epididymis hours (6) or Days (7, 14, 21, 28, 60) later, to determine the variables: number of spermatozoa, sperm viability, motility and progressive motility, sperm DNA integrity as established by the TUNEL method, embryo implantation rate, and sex ratio of the fetuses conceived using the heat-exposed spermatozoa. Our results indicate that transient mild heat treatment does not affect in the same way the different types of male germ cells. Spermatocytes present within the testis at the time of heat stress resulted into a lower concentration of spermatozoa with reduced viability and low motility. Even though, DNA integrity of spermatozoa resulting from spermatocytes was also compromised by heat stress, the higher degree of DNA damage was found among spermatozoa resulting from spermatids present within the testis at the time of heat stress. At last, heat shock effect on spermatozoa present in the epididymis at the time of thermal stress resulted into a sex ratio distortion. These findings point to a higher sensitivity of spermatocytes to heat exposure and also suggest a different response of X and Y chromosome-bearing spermatozoa to heat stress that warrants further investigation. *Mol. Reprod. Dev.* 75: 40–47, 2008. © 2007 Wiley-Liss, Inc.

**Key Words:** paternal heat stress; sperm; DNA integrity; sex ratio

## INTRODUCTION

Scrotal temperature in mammals is 2–8°C lower than that of the rest of the body and is a requirement for normal spermatogenesis (Banks et al., 2005). Males seem to have developed effective thermoregulatory mechanisms for the testis such that, for example, the scrotum shows the highest density of sweat glands and thus has the greatest cooling capacity. A high testicular temperature impairs spermatogenesis, and could lead to reduced testicular weight and sperm numbers, accompanied by a transient period of partial or complete infertility. This is followed by a gradual return to

normality over a period of one to two spermatogenesis cycles (Jannes et al., 1998). Heat stress not only affects the number and motility of spermatozoa (Jannes et al., 1998), it also reduces the fertilizing capacity of the surviving spermatozoa (Burfening and Van Horn, 1970; Yaeram et al., 2006). Moreover, it temporarily delays embryo growth and promotes degeneration of the embryo (Yaeram et al., 2006). In male mice, spermatogenesis is disrupted by scrotal exposure to environmental temperatures a few degrees over the normal physiological temperature (Sailer et al., 1997; Jannes et al., 1998; Banks et al., 2005) and scrotal heat stress impairs DNA, RNA, and protein synthesis, and causes protein denaturation and abnormal chromatin packing (Steinberger, 1991; Sailer et al., 1997), as well as reducing DNA integrity (Banks et al., 2005). Sperm damage is influenced by the stage at which germ cells are exposed to stress (Hales et al., 2005). Several mechanisms contribute to the cell response to stress involving DNA repair, apoptosis, heat shock response, antioxidant defense mechanisms, and cell cycle checkpoints. Cells at each stage of male germ cell development have unique DNA synthesis and chromosome-associated properties and an ability to repair DNA damage (Favor, 1999). The active stress response mechanism at a given cell development stage may contribute to the differential response of male germ cells to heat stress. Accordingly, in this study we examine the effects of scrotal heat on sperm cells at each stage of spermatogenesis.

In a study performed on heat-stressed male mice, highest subfertility rates were recorded 18–28 days post stress, since during heat exposure the spermatozoa in the ejaculate would have been at the spermatid and spermatocyte stages (Rockett et al., 2001). In addition, Zhu and Setchell (2004) reported that sperm in the

Grant sponsor: Spanish Ministry of Education and Science; Grant numbers: AGL2004-00332, AGL2006-04799.

\*Correspondence to: A. Gutiérrez-Adán, INIA Dpto. Reproducción Animal Carretera de la Coruña km 5.9, 28040 Madrid, Spain.

E-mail: agutierr@inia.es

Received 2 February 2007; Accepted 20 March 2007

Published online 1 May 2007 in Wiley InterScience

(www.interscience.wiley.com).

DOI 10.1002/mrd.20759

epididymis and germ cells in the testis are susceptible to heat stress damage, but that spermatocytes were the most vulnerable. Although some germ cells present in the testis at the time of heat stress underwent apoptotic cell death, other germ cells completed their development and were recovered as motile spermatozoa with damaged DNA (Banks et al., 2005). Besides mice, the adverse effects of hyperthermia on the normal adult testis have been observed in the rat (Lue et al., 2000), cow (Skinner and Louw, 1966), pig (Wettemann et al., 1976), sheep (Mieusset et al., 1991), horse (Love and Kenney, 1999), and in humans (Mieusset et al., 1987, 1992a).

In a recent study performed on the red deer, a relationship was detected between sperm quality, male fertility, and the sex ratio of the offspring (Gomendio et al., 2006). In this study, we tried to determine whether the paternal heat stress known to affect the fertility and quality of sperm (Rockett et al., 2001; Yaeram et al., 2006) could influence the sex ratio of the offspring.

The aims of this study were: (1) to typify the susceptibility to heat stress of the different cell stages of spermatogenesis through the characterization and correlation of several parameters in a single study; (2) to examine effects on the *in vivo* development of preimplantation embryos resulting from the fertilization with sperm that had been exposed to heat at different developmental stages; and (3) to determine whether the scrotal heat stress that diminishes sperm quality also affects the sex ratio of the offspring generated by heat-stressed males.

## MATERIALS AND METHODS

### Animals and Heat Treatment

Mature adult CD1 strain mice were housed in conditions of controlled temperature (23°C), relative humidity (60%), and 14 hr of light per day. Food was available *ad libitum*. All animal experiments were approved by our Institutional Review Board according to the Guide for Care and Use of Laboratory Animals as adopted by the Society for the Study of Reproduction.

Adult male CD1 mice, 8–12 weeks old, were anesthetized using xylazine-ketamine, 0.1 ml/10 g body weight, *i.p.* injected. Xylazine-ketamine was prepared by mixing 1 ml ketamine (100 mg/ml) (Rompun, Bayer AG, Leverkusen, Germany), 0.5 ml xylazine (20 mg/ml) (Imalgene 1000, Merial, Lyon, France) and 8.5 ml ultrapurified water. A cotton string was loosely applied around the scrotum to avoid retraction of the testes to an abdominal position, without constraining testicular vascularization. The males were then passed through a hole in a polystyrene “raft” up to the mid-body level, so that they floated on the water surface with their lower body and testes immersed in water at 42°C (heated) or 33°C (control) for 30 min. After returning to their cages, the animals were placed on a warm mat (25°C) to maintain their body temperature until they had fully recovered from the anesthesia.

Epididymal mature sperm samples were obtained from five animals per treatment group plus five controls at each one of the following time points: 6 hr (Day 0), 7, 14, 21, 28, and 60 days post heat shock. These time points were selected since they correspond to the stage during spermatogenesis when germ cells are most susceptible to damage, that is, the spermatozoa within the epididymis at the time of heating (Day 0) or those developing from the different germ cell types in the testis at the time of heat stress (7–32 days). These cell types and corresponding time points are provided in Table 1. Calculations were based on the mouse spermatogenesis cycle as defined by Oakberg (1956). Animals were euthanized by cervical dislocation. Cauda epididymides and vasa deferentia were retrieved and placed in a prewarmed 500 µl drop of M2 medium after removing all excess adipose tissue and blood vessels to minimize the risk of contamination. Spermatozoa were released from the epididymis by slicing with a 30-gauge needle and left in the medium for 15 min to recover their motility.

### Sperm Characteristics

Sperm counts were performed using a Bürker hemocytometer. Motility was determined by loading a sperm sample onto a prewarmed (37°C) slide and placing on the heated (37°C) microscope stage. Percentages of motile spermatozoa and progressive motile spermatozoa (STR > 85%) were assessed by the Sperm Class Analyzer<sup>®</sup> SCA 2002 (Microptic, S.L., Barcelona, Spain).

### Sperm Viability

Percentages of live and dead sperm cells were determined using a live-cell nucleic acid stain, SYBR-14, in combination with the conventional dead-cell nucleic acid stain, propidium iodide (Garner and Johnson, 1995), according to the staining protocol of the live/dead sperm viability kit (Molecular Probes, Eugene, OR). Briefly, 0.8 µl of 20 µM SYBR-14 working solution and 1.2 µl of 2.4 mM propidium iodide working solution were added to 50 µl of the sperm suspension ( $2-3 \times 10^6$  sperm cells/ml) and incubated at 37°C for 15 min. After 15 min, 20 µl of the sperm suspension were loaded on a glass slide, covered with a cover slip, and immediately observed under

**TABLE 1. Time Points After Heat-Shock Selected for the Recovery of Mature Spermatozoa From the Epididymis and Germ Cell Types Predicted to Have Been Present at the Time of Heat Treatment**

Time point	Stage of development at the time of heat shock
6 hr	Mature spermatozoa in epididymis
7 days	Step 11 spermatid-mature spermatozoa
14 days	Step 1 spermatid-step 11 spermatid
21 days	Stage IV pachytene spermatocyte-step 1 spermatid
28 days	Preleptotene-stage III pachytene
60 days	Type A spermatogonia

a fluorescent microscope equipped with appropriate filters. SYBR-14 stains the nucleus of live sperm green, while dead or membrane-damaged spermatozoa are stained red by the propidium iodide. At least 500 cells were counted per treatment.

### DNA Fragmentation

Single and double-DNA strand breaks were evaluated by the TUNEL method using the In Situ Cell Death Detection Kit (Roche, Mannheim, Germany) according to the manufacturer's instructions (Laberge and Boissonneault, 2005). Slides were rinsed twice in PBS and counterstained with 2 µg/ml 4,6 diamidino-2-phenylindole (DAPI) in Vectashield (Vector, Burlingame, CA). Negative controls lacking the TdT enzyme were run in each replicate. A minimum of 500 spermatozoa per sample were scored under the 40X objective of the fluorescence microscope (Nikon, Tokyo, Japan). The number of sperm per field stained with DAPI (blue) was first counted and the number of cells emitting green fluorescence (TUNEL positive) expressed as a percentage of the total sample cell count.

### Mating, Collection, and Sexing of Fetuses

Fifty CD1 male mice after the heat-stress treatment, which described above, were used for mating superovulated CD1 females. At 6 hr, or 7, 14, 21, and 28 days after heat-stress treatment, 10 males per group were used for mating. The females were superovulated by injecting them with 7.5 IU equine chorionic gonadotrophin (eCG) i.p. (Intervet, Boxmeer, The Netherlands), followed 48 hr later by 7.5 IU human chorionic gonadotropin (hCG) i.p. (HCG Lepori, Farma-Lepori, Barcelona, Spain). After the hCG injection, each female was caged overnight with a single control male or a single male subjected to heat stress. The presence of a vaginal plug the following morning was considered indicative of successful mating. Number of live fetuses and resorption sites were assessed in females euthanized on Day 14 of gestation. The sex of fetuses was determined by the Smcx/Smcy differential band pattern observed after PCR amplification using the primers SM-CXY-F: 5'-CCGCTGCCAAATTCCTTTGG-3' and SM-CXY-R: 5'-TGAAGCTTTTGGCTTTGAG-3' (Fernandez-Gonzalez et al., 2004; Perez-Crespo et al., 2005).

### Sex Determination by Quantitative PCR

The proportions of X and Y chromosome-bearing spermatozoa in mouse semen samples were determined by real time PCR. Two sets of primers were used to amplify specific X and Y chromosome genes. The Y-specific primers, which amplify the *Sry* gene (Zuccotti et al., 2005), rendered an amplification length of 147 bp, while the X-specific primers used, which amplify the *G6pd* gene (Gutierrez-Adan et al., 2000), provided an amplification length of 464 bp. The method used to purify DNA from sperm has been previously described (Madrid-Bury et al., 2005). Details of the quantitative PCR procedure followed have also been described elsewhere (Ramirez et al., 2006). Briefly, PCR was

performed using a Rotorgene 2000 Real Time Cycler™ (Corbett Research, Sydney, Australia) and SYBR Green (Molecular Probes) as a double-stranded DNA-specific fluorescent dye. The PCR reaction mixture (25 µl) contained 2.5 µl 10 × buffer, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 U Taq Express (MWGAG Biotech, Ebersberg, Germany), 100 µM of each dNTP, and 0.2 µM of each primer. In addition, the double-stranded DNA dye, SYBR Green I, (1:3,000 of 10,000 × stock solution) was included in each reaction. The PCR protocol involved an initial step at 94°C (2 min), followed by 40 cycles at 94°C (15 s), 56°C (30 s) and 72°C (30 s). Fluorescent data were acquired at 85°C. The melting protocol consisted of holding at 40°C for 60 s and then heating from 50 to 94°C, holding at each temperature for 5 s while monitoring fluorescence. Product identity was confirmed by ethidium-bromide-stained 2% agarose gel electrophoresis. In addition, amplicon identities were confirmed by sequencing the PCR products. The comparative CT method was used for quantification of expression levels (Fernandez-Gonzalez et al., 2004) using GAPDH as endogenous control.

### Statistical Analysis

Percentages of viable, motile, progressive motile, TUNEL+ spermatozoa were compared by one-way repeated-measures ANOVA (followed by multiple pair-wise comparisons using Student-Newman-Kleus method). To normalize percentage data, Arcsin Square Root quick transform was applied to the percentages of motile, progressive motile and TUNEL+ spermatozoa. Mean number of implantations, fetuses, and resorption sites per pregnancy were compared by *t*-test. Pregnancy rates and proportions of males were compared using the *z*-test. Differences in mRNA expression assayed by quantitative RT-PCR were analyzed by one-way repeated-measures ANOVA (followed by multiple pair-wise comparisons using the Student-Newman-Kleus method). All the statistical analyses described were performed using the SigmaStat (Jandel Scientific, San Rafael, CA) program.

## RESULTS

### Sperm Variables

Sperm concentrations were significantly reduced 7, 14, 21, 28 or 60 days after heat stress treatment (Table 2). Percentages of live spermatozoa were also significantly lower 7, 14, 21, and 28 day after treatment, the greatest reduction being recorded at 28 days post heat shock (Table 2). Heat shock also provoked significantly reduced sperm motility and progressive motility values after 14, 21, and 28 days, with lowest sperm motility values observed 21 days after treatment (Table 2).

### Sperm DNA Damage

The percentages of TUNEL positive spermatozoa recovered from the epididymis 6 hr or 7, 14, 21, or 28 days after the 30 min-heat treatment were significantly higher compared to control animals. The greatest



**TABLE 2. Sperm Characteristics Determined in Male Mice, 0, 7, 14, 21, 28, and 60 Days After Scrotal Heat Treatment (30 min)**

Sperm characteristics*	Control	Day 0	Day 7	Day 14	Day 21	Day 28	Day 60
Concentration ( $\times 10^6/\text{ml}$ )	$22 \pm 2.6^a$	$16 \pm 5.2^{a,b}$	$8.8 \pm 1.5^b$	$9.8 \pm 0.7^b$	$10.7 \pm 1.8^b$	$7.5 \pm 2.2^b$	$8.5 \pm 3.3^b$
Viability (%)	$77 \pm 3.7^a$	$74.7 \pm 3.5^{a,b}$	$62.6 \pm 3^b$	$53 \pm 15.3^b$	$50.1 \pm 9.3^{b,c}$	$38.8 \pm 3.1^c$	$65.5 \pm 6^{a,b}$
Motility (%)	$66.7 \pm 4.4^a$	$66 \pm 2.3^a$	$60.3 \pm 4^a$	$28.8 \pm 11^{b,c}$	$8.6 \pm 3.5^c$	$37.3 \pm 2.3^b$	$56 \pm 6^a$
Progressive motility (%)	$38.7 \pm 2.9^a$	$39.3 \pm 7.8^a$	$31.7 \pm 5.1^a$	$5.5 \pm 2.4^b$	$6.3 \pm 2.3^b$	$6.6 \pm 2.8^b$	$34 \pm 15^a$

\*At each time point, five males were used for the determination of sperm characteristics.

Each value given is mean  $\pm$  SEM. Values with different alphabetical superscripts differ significantly ( $P < 0.01$ ) (ANOVA analysis).

increment was observed 14 days after treatment. When we recovered spermatozoa 60 days after heat stress, the percentages of TUNEL positive spermatozoa did not differ significantly to those observed in control animals (Fig. 1).

### Effects of Paternal Heat Stress on Pregnancy Rate, Number of Fetuses, Resorptions, and Sex Ratio

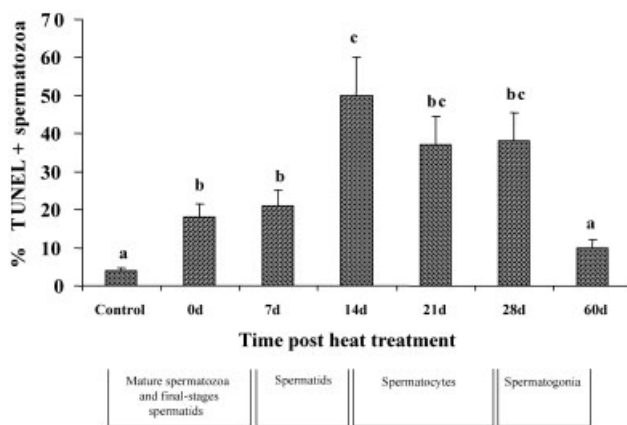
After mating heat-stressed males with females, no differences in the pregnancy rate were observed (Table 3) among heat stress treatments. The mean number of fetuses per pregnancy observed on Day 14 of gestation in females mated with males 21 and 28 days after heat treatment were significantly lower compared to controls (Table 3). No differences were observed in the mean values of resorption sites per pregnancy (Table 3). The sex ratio was only distorted when males were mated with females on the same day of scrotal heat treatment (Fig. 2). In this group of animals ( $n = 10$ ), the proportion of males among the offspring was significantly lower compared to the control group ( $z$  test,  $P < 0.05$ ). For the present purposes, we modified a recently described real-time PCR procedure for determining proportions of X and Y chromosome-bearing spermatozoa in semen samples (Parati et al., 2006). The method was validated

for mice by a series of accuracy, repeatability, and reproducibility assays (data not shown). The overall proportions of X and Y chromosome-bearing spermatozoa for all the semen samples analyzed, including semen from males that had rendered a modified sex ratio, indicated no significant difference from the expected 1:1 ratio.

### DISCUSSION

The results of this study indicate that a single 30 min-session of mild scrotal heat treatment differentially affects the different types of germ cell present in the mouse testis (Table 4). The spermatozoa derived from these cell types showed varying anomalies that could have different consequences on their fertility and the offspring they generate. We found that when spermatocytes were subjected to heat treatment it produced subfertility, whereas when spermatids underwent treatment, the resultant sperm showed highly fragmented DNA; moreover, when we examined the effects of heat on mature sperm cells in the epididymis, the resultant sex ratio of the offspring was distorted.

Our findings are consistent with previous reports indicating that both whole body heating and local heating of the scrotum lead to decreased concentrations, motility, and viability of sperm recovered from mice (Jannes et al., 1998; Zhu et al., 2004; Banks et al., 2005) and farm animals species (Larsson and Einarsson, 1984; Malmgren and Larsson, 1984; Skinner and Louw, 1966; Mieusset et al., 1992b). In our study, some of these effects (reduced sperm concentrations and viability) were evident as early as 7 days after heat treatment. These affected spermatozoa must have arisen from cells that were just leaving the testis or just entered the caput epididymis at the time of heat stress, since developing mouse spermatozoa take 3–7 days to pass through the epididymis (Meistrich et al., 1973). Fourteen days after heating, effects on sperm quality were more dramatic and included reduced motility and progressive motility. After this time span, spermatozoa present in the epididymis would have been derived from cells that were spermatids at the time of heating. The deleterious effect persisted 21 and 28 days after heating, when spermatozoa collected would have developed from cells that were spermatocytes when heated. However, viability, motility, and progressive motility values for spermatozoa recovered from the epididymis 60 days after heat stress were similar to those observed in



**Fig. 1.** Extent of DNA damage, as determined by the TUNEL assay, in spermatozoa from mice subjected to transient scrotal heating. The bottom scale represents the stage of development of the germ cell types predicted to be present at the time of heat shock. (timings based on Oakberg, (Oakberg 1956)). a,b values with different superscripts differ significantly according to ANOVA.

**TABLE 3. Pregnancy Rates In Vivo, Mean Numbers of Implantation Sites Per Pregnancy, Mean Number of Day 14 Fetuses Per Pregnancy, and Mean Number of Resorption Sites Per Pregnancy in Females Mated With Heat-Stressed Males at the Different Time Points**

Days after heating	Pregnant females/ females mated		Implantation sites/ pregnant female	Mean number of fetuses/pregnant female	Mean number of resorption sites/pregnant female
	n	%			
Control	13/19	68.4	24.7 ± 4 <sup>a</sup>	22.7 ± 4.3 <sup>a</sup>	2 ± 0.7
0–7 days (target cells = spermatozoa)	14/20	70	17.6 ± 2.4 <sup>a,b</sup>	14.7 ± 3 <sup>a,b</sup>	2.9 ± 1.3
Day 14 (target cells = 21–28 days (target cells = spermatocytes)	6/10	60	20.3 ± 3.9 <sup>a,b</sup>	17 ± 4.6 <sup>a,b</sup>	3.3 ± 1.8
	15/20	75	13.3 ± 2.2 <sup>b</sup>	11.2 ± 2.4 <sup>b</sup>	2 ± 0.8

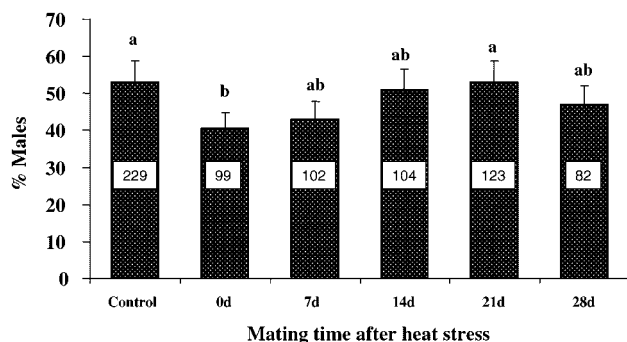
Values are means ± SEM. Values in the same row with different superscripts differ significantly (ANOVA,  $P < 0.05$ ).

control animals, although sperm concentrations were significantly lower than for the control group. After this time span, we were evaluating spermatozoa produced in the next spermatogenic cycle, so this observation could indicate that the first spermatogenic cycle after heat stress progresses correctly but that the testes are still unable to produce a normal number of spermatozoa. Supporting this hypothesis is the fact that even 68 days after scrotal heat stress in mice, normal testis weight is not fully recovered (Rockett et al., 2001).

Several mechanisms could be involved in the detrimental effects of heat. For instance, the decreased motility observed in our study 14, 21, and 28 days after heat stress could indicate damage to germ cell mitochondria since there is increasing evidence that sperm motility is strongly dependent on the ATP supplied by the mitochondrial oxidative phosphorylation system (OXPHOS) (Ruiz-Pesini et al., 1998). Heat also affects gene expression (Rockett et al., 2001) and produces other effects such as a temporary reduction in relative testis weight (Jannes et al., 1998). Thus, it has been established that the initial drop in testis weight peaks at 15 days post heat stress, and then gradually recovers (Rockett et al., 2001). It has also been reported that the testicular germ-cell loss observed in response to abdominal heat stress occurs by apoptosis (Yin et al., 1997; Banks et al., 2005). In addition, heat produces

chromosomes dissociation (van Zelst et al., 1995). Hence, some authors have argued that meiotic non-disjunction could give rise to chromosomally unbalanced gametes with a potential to fertilize eggs, but that these would render aneuploid zygotes subject to post zygotic elimination (Setchell et al., 1988). Effectively, this rationale could explain the reduced litter sizes we obtained when males were mated 21–28 days post heat stress, although this might not be the only explanation. We are in agreement with other authors (Rockett et al., 2001) who only observed a reduction in the number of fetuses at this time point (21–28 days post heat stress). The reduced litter sizes were not related with an increase in the number of resorption sites; it was due to the fact that the number of implantation sites per pregnancy when males were mated 21–28 days post heat stress were also lower than in controls (Table 3). The reduced implantation rate observed could be interpreted as a consequence of the subfertility of the males or a reduction in the quality of the embryos.

Several studies have demonstrated that the DNA integrity or nuclear chromatin structure of epididymal spermatozoa, assessed by the COMET assay or by the sperm chromatin structure assay (SCSA), are compromised when males are subjected to scrotal heating (Sailer et al., 1997; Yin et al., 1997; Banks et al., 2005). DNA fragmentation can occur directly in spermatozoa as a consequence of exposure to endogenous (reactive oxygen species, ROS) or exogenous mutagens or by alterations in the process of creating and repairing nicks during spermiogenesis, or may be the result of germ cell apoptosis (Ahmadi and Ng, 1999; Sakkas et al., 1999, 2002; Alvarez et al., 2002). Banks et al. (2005) have shown that subjecting the testis to transient heat stress increases the level of apoptosis in germ cells, but that surviving cells are able to continue spermatogenesis to form spermatozoa carrying damaged DNA. Our results confirm these findings and indicate that heat stress damages the spermatogonia, spermatocytes, spermatids or spermatozoa present in the testis and epididymis at the time of heating. However, the susceptibility of the different developmental stages to heat differs, probably because protamines in condensed DNA are more resistant to



**Fig. 2.** Percentage of males among the offspring of heat-stressed males mated with CD1 females. a,b values with different superscripts differ significantly according to ANOVA. Numbers inside the boxes indicate the number of fetuses analyzed in each group.

**TABLE 4. Effects of Scrotal Heat Stress on Sperm Characteristics, Implantation Rates and the Sex Ratios of the Fetuses Produced Using the Heat-Stressed Sperm**

Days after heat shock	Sperm			UNEL+ sperm	Implantation/ pregnancy	Sex ratio offspring	Susceptibility to heat stress <sup>a</sup>
	Concentration	Viability	Motility				
Day 0	No	No	No	*	No	*	2
Day 7	*	*	No	*	No	No	3
Day 14	*	*	*	**	No	No	5
Day 21	*	**	*	**	*	No	7
Day 28	**	**	*	**	*	No	8
Day 60	*	No	No	No	ND	No	1

\*Discrete effect.

\*\*Intense effect.

<sup>a</sup>Relative levels of susceptibility to heat stress.

heat-induced fragmentation. The highest DNA damage was observed in spermatozoa recovered 14 days post heat treatment. At this specific time, spermatozoa would have arisen from male germ cells at the developmental stage step 1–11 spermatid. Marcon and Boissonneault (2004) reported that during the normal process of spermiogenesis, strand breaks take place in step 9–11 spermatids and that these breaks are associated with the condensation of germ cell DNA and replacement of histones with protamines. This open chromatin conformation, besides being incompatible with DNA repair and apoptosis, appears to make spermatids highly vulnerable to the damaging effects of heat. Previous reports have indicated that spermatocytes and round spermatids are the cell types most sensitive to heat stress (Yin et al., 1997). Our results also confirm that spermatocytes are vulnerable to heat stress, since the extent of DNA damage in spermatozoa recovered 21–28 days after testicular heat treatment was significantly greater than in controls. During meiotic prophase, there is substantial DNA rearrangement within the nuclei of leptotene, zygotene, and pachytene spermatocytes. In many of these cells, this DNA damage cannot be fully repaired, yet the damaged cells are able to complete their development and are released into the epididymis. Thus, the differences we observed between spermatids and spermatocytes could be attributable to the fact that post meiotic germ cells have lost their ability to initiate an apoptotic response and that DNA repair is unlikely to occur late in spermatogenesis. Notwithstanding, in premeiotic germ cells, DNA repair and apoptotic mechanisms are still functional. Accordingly, we noted a similar degree of DNA damage in spermatozoa recovered 60 days after testicular heating than in controls. Most of these spermatozoa would have arisen from Type A spermatogonia indicating either a more efficient DNA damage repair mechanism or greater resistance to damage.

It has been reported that exposure of the paternal whole body to heat stress for 24 hr affects the development of mouse preimplantation embryos rendered by the heat-treated mature or developing spermatozoa. In this study, the *in vivo* and *in vitro* development of preimplantation embryos decreased after 3–35 days of heat stress, reaching a peak 21 days after heating (Zhu

et al., 2004). In our experiments, however, implanted fetus losses did not occur immediately after heat exposure (0–14 days). This implies that a short period of scrotal heat stress is more detrimental for developing than for mature germ cells. The decrease in the number of implanted fetuses we have observed is not attributable to DNA damage induced by heat stress, since spermatozoa recovered 0–14 days after heat treatment, also showed a significantly higher number of sperm cells with fragmented DNA than controls, yet there was no reduction in the number of fetuses produced.

Our finding that sex ratio distortion was only evident when heat stress affected mature spermatozoa ready for fertilization has not been previously reported. It has been suggested (Banks et al., 2005) that increased epididymal temperature could result in an increased level of oxidative stress in the epididymis and thus an unfavorable epididymal environment. Other authors have indicated that a raised temperature causes changes in oxygen levels, water and ion transport mechanisms, protein biosynthesis and secretion, and also modifies the cell structure of the epididymal epithelium (Seiler et al., 2000). We suggest that this altered environment could differently affect the functionality of sperm carrying X or Y chromosomes for a short period, such that the functionality of spermatozoa retrieved 7, 14, 21, 28 or 60 days after heat stress was not affected.

The effects of heat stress are influenced by the sensitivity of the different germ cells in the testis. Thus, taken together, our data (Table 4) suggest that spermatocytes are the cell type most susceptible to heat exposure, followed by spermatids, sperm, and finally spermatogonia. A further finding was the relationship observed between scrotal heating and a decline in the sex ratio noted among the offspring of males mated a few hours after heat treatment. Future studies should address the mechanism suggested here since it could be that sperm carrying X or Y chromosomes show a different response to situations of high oxidative stress.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Grants AGL2004-00332 and AGL2006-04799 from the Spanish Ministry of Education and Science. Preliminary results have been

presented in the 8th International Meeting of the Spanish Association for Animal Reproduction (AERA) Murcia, 2006 (Perez-Crespo et al., 2006).

## REFERENCES

- Ahmadi A, Ng SC. 1999. Developmental capacity of damaged spermatozoa. *Hum Reprod* 14:2279–2285.
- Alvarez JG, Sharma RK, Ollero M, Saleh RA, Lopez MC, Thomas AJ, Jr., Evenson DP, Agarwal A. 2002. Increased DNA damage in sperm from leukocytospermic semen samples as determined by the sperm chromatin structure assay. *Fertil Steril* 78:319–329.
- Banks S, King SA, Irvine DS, Saunders PT. 2005. Impact of a mild scrotal heat stress on DNA integrity in murine spermatozoa. *Reproduction* 129:505–514.
- Burfening PJ, Van Horn JL. 1970. Induction of fertile oestrus in prepubertal ewes during the anoestrous season. *J Reprod Fertil* 23:147–150.
- Favor J. 1999. Mechanisms of mutation induction in germ cells of the mouse as assessed by the specific locus test. *Mutat Res* 428:227–236.
- Fernandez-Gonzalez R, Moreira P, Bilbao A, Jimenez A, Perez-Crespo M, Ramirez MA, Rodriguez De Fonseca F, Pintado B, Gutierrez-Adan A. 2004. Long-term effect of in vitro culture of mouse embryos with serum on mRNA expression of imprinting genes, development, and behavior. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:5880–5885.
- Garner DL, Johnson LA. 1995. Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide. *Biol Reprod* 53:276–284.
- Gomendio M, Malo AF, Soler AJ, Fernandez-Santos MR, Estes MC, Garcia AJ, Roldan ER, Garde J. 2006. Male fertility and sex ratio at birth in red deer. *Science* 314:1445–1447.
- Gutierrez-Adan A, Oter M, Martinez-Madrid B, Pintado B, De La Fuente J. 2000. Differential expression of two genes located on the X chromosome between male and female in vitro-produced bovine embryos at the blastocyst stage. *Mol Reprod Dev* 55:146–151.
- Hales BF, Aguilar-Mahecha A, Robaire B. 2005. The stress response in gametes and embryos after paternal chemical exposures. *Toxicol Appl Pharmacol* 207:514–520.
- Jannes P, Spiessens C, Van der Auwera I, D'Hooghe T, Verhoeven G, Vanderschueren D. 1998. Male subfertility induced by acute scrotal heating affects embryo quality in normal female mice. *Hum Reprod* 13:372–375.
- Laberge RM, Boissonneault G. 2005. On the nature and origin of DNA strand breaks in elongating spermatids. *Biol Reprod* 73:289–296.
- Larsson K, Einarsson S. 1984. Seminal changes in boars after heat stress. *Acta Vet Scand* 25:57–66.
- Love CC, Kenney RM. 1999. Scrotal heat stress induces altered sperm chromatin structure associated with a decrease in protamine disulfide bonding in the stallion. *Biol Reprod* 60:615–620.
- Lue Y, Hikim AP, Wang C, Im M, Leung A, Swerdloff RS. 2000. Testicular heat exposure enhances the suppression of spermatogenesis by testosterone in rats: The “two-hit” approach to male contraceptive development. *Endocrinology* 141:1414–1424.
- Madrid-Bury N, Perez-Gutierrez JF, Perez-Garnelo S, Moreira P, Pintado Sanjuanbenito B, Gutierrez-Adan A, de la Fuente Martinez J. 2005. Relationship between non-return rate and chromatin condensation of deep frozen bull spermatozoa. *Theriogenology* 64:232–241.
- Malmgren L, Larsson K. 1984. Semen quality and fertility after heat stress in boars. *Acta Vet Scand* 25:425–435.
- Marcon L, Boissonneault G. 2004. Transient DNA strand breaks during mouse and human spermiogenesis new insights in stage specificity and link to chromatin remodeling. *Biol Reprod* 70:910–918.
- Meistrich ML, Eng VW, Loir M. 1973. Temperature effects on the kinetics of spermatogenesis in the mouse. *Cell Tissue Kinet* 6:379–393.
- Mieusset R, Bujan L, Mansat A, Pontonnier F, Grandjean H. 1987. Hyperthermia and human spermatogenesis: Enhancement of the inhibitory effect obtained by ‘artificial cryptorchidism’. *Int J Androl* 10:571–580.
- Mieusset R, Quintana Casares PI, Sanchez-Partida LG, Sowerbutts SF, Zupp JL, Setchell BP. 1991. The effects of moderate heating of the testes and epididymides of rams by scrotal insulation on body temperature, respiratory rate, spermatozoa output and motility, and on fertility and embryonic survival in ewes inseminated with frozen semen. *Ann N Y Acad Sci* 637:445–458.
- Mieusset R, Bujan L, Mansat A, Pontonnier F. 1992a. Scrotal hyperthermia and male infertility. *Prog Urol* 2:31–35; discussion 35–36.
- Mieusset R, Quintana Casares P, Sanchez Partida LG, Sowerbutts SF, Zupp JL, Setchell BP. 1992b. Effects of heating the testes and epididymides of rams by scrotal insulation on fertility and embryonic mortality in ewes inseminated with frozen semen. *J Reprod Fertil* 94:337–343.
- Oakberg EF. 1956. Duration of spermatogenesis in the mouse and timing of stages of the cycle of the seminiferous epithelium. *Am J Anat* 99:507–516.
- Parati K, Bongioni G, Aleandri R, Galli A. 2006. Sex ratio determination in bovine semen: A new approach by quantitative real time PCR. *Theriogenology* 66:2202–2209.
- Perez-Crespo M, Ramirez MA, Fernandez-Gonzalez R, Rizos D, Lonergan P, Pintado B, Gutierrez-Adan A. 2005. Differential sensitivity of male and female mouse embryos to oxidative induced heat-stress is mediated by glucose-6-phosphate dehydrogenase gene expression. *Mol Reprod Dev* 72:502–510.
- Perez-Crespo M, Pericuesta E, Rey R, Gutierrez-Adan A. 2006. OC6 scrotal heat stress in mice affects viability and DNA integrity of sperm, and sex ratio of the offspring. *Reprod Domest Anim* 41:104.
- Ramirez MA, Pericuesta E, Fernandez-Gonzalez R, Moreira P, Pintado B, Gutierrez-Adan A. 2006. Transcriptional and post-transcriptional regulation of retrotransposons IAP and MuERV-L affect pluripotency of mice ES cells. *Reprod Biol Endocrinol* 4:55.
- Rockett JC, Mapp FL, Garges JB, Luft JC, Mori C, Dix DJ. 2001. Effects of hyperthermia on spermatogenesis, apoptosis, gene expression, and fertility in adult male mice. *Biol Reprod* 65:229–239.
- Ruiz-Pesini E, Diez C, Lapena AC, Perez-Martos A, Montoya J, Alvarez E, Arenas J, Lopez-Perez MJ. 1998. Correlation of sperm motility with mitochondrial enzymatic activities. *Clin Chem* 44:1616–1620.
- Sailer BL, Sarkar LJ, Bjordahl JA, Jost LK, Evenson DP. 1997. Effects of heat stress on mouse testicular cells and sperm chromatin structure. *J Androl* 18:294–301.
- Sakkas D, Mariethoz E, Manicardi G, Bizzaro D, Bianchi PG, Bianchi U. 1999. Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Rev Reprod* 4:31–37.
- Sakkas D, Moffatt O, Manicardi GC, Mariethoz E, Tarozzi N, Bizzaro D. 2002. Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. *Biol Reprod* 66:1061–1067.
- Seiler P, Cooper TG, Nieschlag E. 2000. Sperm number and condition affect the number of basal cells and their expression of macrophage antigen in the murine epididymis. *Int J Androl* 23:65–76.
- Setchell BP, D’Occhio MJ, Hall MJ, Laurie MS, Tucker MJ, Zupp JL. 1988. Is embryonic mortality increased in normal female rats mated to subfertile males? *J Reprod Fertil* 82:567–574.
- Skinner JD, Louw GN. 1966. Heat stress and spermatogenesis in *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle. *J Appl Physiol* 21:1784–1790.
- Steinberger A. 1991. Effects of temperature on the biochemistry of the testis. *Adv Exp Med Biol* 286:33–47.
- van Zelst SJ, Zupp JL, Hayman DL, Setchell BP. 1995. X-Y chromosome dissociation in mice and rats exposed to increased testicular or environmental temperatures. *Reprod Fertil Dev* 7:1117–1121.
- Wettmann RP, Wells ME, Omtvedt IT, Pope CE, Turman EJ. 1976. Influence of elevated ambient temperature on reproductive performance of boars. *J Anim Sci* 42:664–669.

- Yaeram J, Setchell BP, Maddocks S. 2006. Effect of heat stress on the fertility of male mice in vivo and in vitro. *Reprod Fertil Dev* 18:647–653.
- Yin Y, Hawkins KL, DeWolf WC, Morgentaler A. 1997. Heat stress causes testicular germ cell apoptosis in adult mice. *J Androl* 18:159–165.
- Zhu BK, Setchell BP. 2004. Effects of paternal heat stress on the in vivo development of preimplantation embryos in the mouse. *Reprod Nutr Dev* 44:617–629.
- Zhu B, Walker SK, Oakey H, Setchell BP, Maddocks S. 2004. Effect of paternal heat stress on the development in vitro of preimplantation embryos in the mouse. *Andrologia* 36:384–394.
- Zuccotti M, Sebastiano V, Garagna S, Redi CA. 2005. Experimental demonstration that mammalian oocytes are not selective towards X- or Y-bearing sperm. *Mol Reprod Dev* 71: 245–246.

**CAPÍTULO III. Los factores liberados por espermatozoides con la membrana plasmática dañada afectan a la integridad del ADN espermático y a la implantación de los embriones producidos.**

Factors from damaged sperm affect its DNA integrity and its ability to promote embryo implantation in mice (2008) *Journal of Andrology* 29(1): 47-54.



## 6.1. Resumen

La integridad del ADN espermático es un parámetro de importancia crítica en fertilidad, especialmente cuando se realizan técnicas de reproducción asistida como la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI). En este trabajo, el objetivo fue determinar el papel de los factores liberados por espermatozoides con daño en su membrana plasmática, hecho habitual en procesos de congelación y descongelación en ausencia de crioprotectores. Determinar cómo estos factores influyen en la degradación del ADN de los espermatozoides tratados y las posibles consecuencias derivadas de su utilización en la técnica de ICSI, fueron los principales objetivos que motivaron el desarrollo de este experimento.

Los espermatozoides recogidos de ratones híbridos B6D2F1 se incubaron durante 90 minutos en el medio obtenido tras la congelación y descongelación de espermatozoides en ausencia de crioprotectores (medio condicionado, MC). En primer lugar se evaluó mediante el ensayo de TUNEL el porcentaje de espermatozoides con ADN fragmentado; posteriormente, tras la realización de ICSI, se analizó el desarrollo embrionario *in vitro* e *in vivo*, la tasa de implantación y el número de fetos obtenidos el día 14 de gestación. Los resultados mostraron que la incubación de los espermatozoides durante 90 minutos en MC provocó un aumento de la fragmentación del ADN espermático. Tras la realización de ICSI, se observó que la incubación de los espermatozoides en MC no afectaba a la tasa de fecundación, ni al número ni a la morfología de los blastocistos; sin embargo, la tasa de implantación se vio significativamente reducida, lo que indicó un efecto negativo sobre la calidad embrionaria. Independientemente de las condiciones a las que fueron sometidos los espermatozoides, el cultivo *in vitro* provocó una reducción del porcentaje de fetos obtenidos el día 14 de gestación, lo cual demuestra que el cultivo *in vitro* reduce la viabilidad de los embriones producidos mediante ICSI.

Nuestros resultados demuestran que existen factores liberados por espermatozoides con la membrana plasmática deteriorada que pueden inducir fragmentación del ADN de los espermatozoides con membrana no dañada y reducir los porcentajes de implantación de los embriones producidos a partir de dichos espermatozoides. Las observaciones realizadas en este trabajo sugieren que la evaluación de la fragmentación del ADN espermático puede ser de gran utilidad en la predicción de la tasa de implantación de los embriones producidos mediante ICSI.





## 6.2 Diseño experimental

En este capítulo se divide en dos experimentos principales:

**Experimento 6.1:** Experimento diseñado para evaluar si los factores liberados por espermatozoides que presentan daño en su membrana plasmática intervienen en el proceso de degradación del ADN espermático.

Los factores liberados por espermatozoides con daño en su membrana plasmática que consideramos en este experimento son los factores liberados tras someter a los espermatozoides a procesos de congelación y descongelación en ausencia de crioprotectores; para ello, preparamos un medio especial que denominamos medio condicionado (MC) que contiene dichos factores. En el esquema 3.1. se describe cómo se prepara el MC.

En este primer experimento las muestras espermáticas obtenidas de la cola del epidídimo y del conducto deferente de siete machos B6D2F1, fueron sometidas a diferentes condiciones experimentales antes de proceder a su análisis:

- a) Espermatozoides recogidos en M2 y analizados inmediatamente después de ser recogidos. Es el grupo conocido como “espermatozoides no incubados”.
- b) Espermatozoides incubados durante 90 minutos en M2.
- c) Espermatozoides incubados durante 90 minutos en MC.
- d) Espermatozoides incubados durante 90 minutos en un medio preparado tras la adición de EDTA al MC con el fin de obtener un medio donde la concentración de EDTA sea 0.05M. Añadimos EDTA porque es un quelante de iones  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ , y por lo tanto, esperaríamos que en estas condiciones los factores liberados en el MC, y que utilizan estos iones para ejercer su acción, no actuarían al encontrarse quelados.

Tras someter a los espermatozoides a las condiciones experimentales descritas, se procede a la determinación del porcentaje de espermatozoides viables mediante la tinción yoduro de propidio y SYBR Green y a la determinación del porcentaje de espermatozoides con fragmentación del ADN espermático mediante TUNEL.

### **Pasos llevados a cabo para la preparación del medio condicionado**

Los espermatozoides se recogen de la cola del epidídimo y del conducto deferente de un macho B6D2F1. Se mide la concentración espermática y se diluye, en caso de ser necesario, para obtener una concentración final de  $10 \times 10^6$  espermatozoides/ml. La muestra espermática se introduce en un tubo de 1.5 ml.



La muestra se congela en nitrógeno líquido en ausencia de crioprotectores y se descongelan a temperatura ambiente. Estos pasos se repiten tres veces.



Los espermatozoides se incuban durante 120 minutos a temperatura ambiente y después se centrifugan a 10.000 r.p.m. durante 3 minutos.



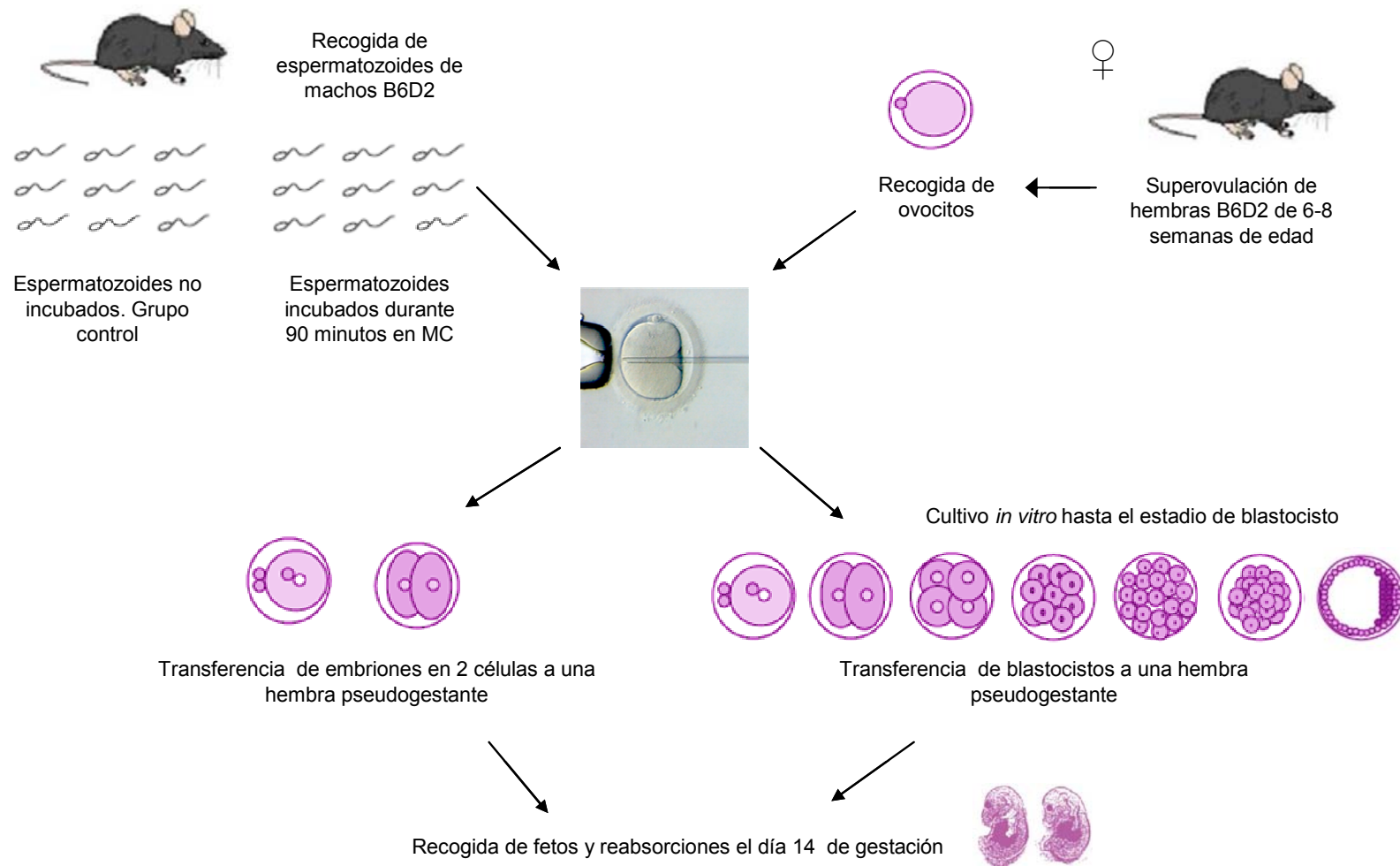
Después de la centrifugación se recoge el sobrenadante y eso es lo que conocemos como medio condicionado (MC)

**Experimento 6.2:** Experimento diseñado para determinar las consecuencias que tiene sobre el desarrollo embrionario la realización de ICSI con espermatozoides procedentes de muestras con diferente grado de fragmentación del ADN espermático.

Para este segundo experimento, utilizamos muestras espermáticas sometidas a dos de las condiciones experimentales descritas anteriormente; por una parte, los espermatozoides no incubados representan el grupo control y, por otra, los espermatozoides incubados durante 90 minutos en MC representan la muestra espermática con un nivel de fragmentación del ADN mayor al observado en la muestra control. Estas muestras se recogen de ocho machos B6D2F1.

Se recogen ovocitos de veinticuatro hembras B6D2F1 previamente superovuladas y estos ovocitos son fecundados mediante ICSI utilizando las muestras espermáticas descritas. La técnica de ICSI empleada es la descrita por Moreira et al. (2004) y Moreira et al. (2007).

En los cigotos resultantes se evalúa la tasa de división a dos células. Con el fin de evaluar cómo se ve afectado el desarrollo embrionario tanto *in vitro* como *in vivo*, los embriones en estadio de dos células se dividen en dos grupos experimentales. Un grupo de embriones es transferido a hembras pseudogestantes en el estadio de dos células y otro grupo de embriones es mantenido en cultivo *in vitro* hasta el estadio de blastocisto, momento en el que se transfieren. En el día 14 de gestación las hembras se sacrifican y se cuantifican el número de fetos y reabsorciones. El diseño de este experimento se ilustra en la Fig 6.1.



**Fig 6.1.** Representación esquemática del protocolo correspondiente al experimento 6.2 en el que se determinaron las consecuencias que tiene sobre el desarrollo embrionario la realización de ICSI a partir de muestras con diferente grado de fragmentación del ADN.



# Factors From Damaged Sperm Affect Its DNA Integrity and Its Ability to Promote Embryo Implantation in Mice

M. PÉREZ-CRESPO, P. MOREIRA, B. PINTADO, AND A. GUTIÉRREZ-ADÁN

*From the Departamento de Reproducción Animal y Conservación de Recursos Zoo genéticos, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, Carretera de la Coruña, Madrid, Spain.*

**ABSTRACT:** Endogenous nucleases in mouse sperm can be activated by freeze-thawing the spermatozoa in media without cryoprotection and cleaving spermatozoa DNA. The role of sperm chromatin integrity during intracytoplasmic sperm injection (ICSI) is of critical importance. We analyzed in the B6D2 mouse the proportion of DNA-fragmented spermatozoa (DFS) produced by incubation in conditioned medium (CM) generated by freeze-thawing sperm in the absence of cryoprotection. We then examined the subsequent development, implantation, and offspring obtained after ICSI with incubated spermatozoa. When fresh sperm cells were incubated for 90 minutes in this CM, a significant increase in the amount of DFS was detected by the terminal deoxynucleotidyl transferase biotin-dUTP nick end labeling assay (27% vs 4.5% in fresh sperm). After ICSI of fresh and incubated spermatozoa, embryos were cultured in vitro to either the 2-cell or blastocyst stage before they were transferred into pseudopregnant CD1

females. On day 14, recipients were sacrificed, and implantation rates, estimated as the number of live fetuses plus resorptions, were determined. When ICSI was performed with sperm incubated in CM, no effects on fertilization, embryo cleavage, blastocyst rate, or blastocyst morphology were detected; however, the quality of the embryos was affected because the total implantation rate decreased significantly ( $P < .05$ ) when 2-cell embryos or blastocysts were transferred. Independently of sperm pretreatment, in vitro cultures significantly affected the percentage of live fetuses present on day 14 of pregnancy. These results demonstrated that there are factors released from fragmented spermatozoa capable of inducing DNA fragmentation in intact sperm that may compromise, to some extent, birth rates after ICSI.

**Key words:** Sperm endonucleases, DNA integrity, ICSI, embryo quality.

**J Androl 2008;29:47–54**

DNA damage in the male germ line has been associated with poor semen quality (Kodama et al, 1997; Irvine et al, 2000; Chan et al, 2001; Tomlinson et al, 2001; Saleh et al, 2003; McVicar et al, 2004), low fertilization rates (Aitken, 2004), impaired preimplantation development (Sun et al, 1997; Sakkas et al, 1998; Ahmadi and Ng, 1999a; Filatov et al, 1999; Morris 2002; Tesarik et al, 2002; Bungum et al, 2004; Tesarik et al, 2004; Fatehi et al, 2006), increased abortion rates (Ahmadi and Ng, 1999a; Carrell et al, 2003a, b; Saleh et al, 2003; Borini et al, 2006), and an elevated incidence of disease in the offspring (Aitken et al, 2003; Baker and Aitken, 2005), including childhood cancer (Ji et al, 1997; Zenzes, 2000; Arnon et al, 2001; Marchetti and Wyrobek, 2005). Other studies have reported that DNA-damaged sperm has the ability to fertilize the

oocyte, but the subsequent embryonic development is related to the degree of DNA damage (Ahmadi and Ng, 1999a). Under normal circumstances, the DNA damage brought into the zygote by the fertilizing spermatozoon is probably effectively repaired by the oocyte (Ahmadi and Ng, 1999b; Braude et al, 1988; Genesca et al, 1992; Matsuda and Tobari, 1989; Shimura et al, 2002a, b); however, it is also possible that the DNA repair capacity of the oocyte is occasionally damaged as a consequence of factors such as maternal aging (Menezo, 2006) or in vitro culture conditions (Zheng et al, 2005). Under these circumstances, the damage may either remain unrepaired or be aberrantly repaired, creating DNA mutations (Aitken and Baker, 2006). In particular, the oocyte is able to fully repair single-strand DNA breaks; however, if a large amount of double-strand DNA breaks is present, the oocyte can produce “mistakes,” generating genetic mutations that can later block or alter embryo development (Braude et al, 1988). DNA damage that is beyond repair will result in apoptosis and fragmentation of the early embryo or morbidity in later life (Fatehi et al, 2006; Sun et al, 1997). Some studies have been performed in rodents by inducing DNA damage in spermatozoa and examining the impact on embryos, fetuses, and future generations (Hales et al,

This work was supported by grants AGL2006-04799 and AGL2004-00332 from the Spanish Ministry of Education and Science.

Correspondence to: Dr Alfonso Gutiérrez-Adán, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, Departamento de Reproducción Animal, Carretera de la Coruña km 5, 9, 28040 Madrid, Spain (e-mail: agutierr@inia.es).

Received for publication April 27, 2007; accepted for publication July 30, 2007.

DOI: 10.2164/jandrol.107.003194

2005; Zhu and Setchell, 2004). In certain situations, sperm chromatin integrity is of critical importance. A good example is intracytoplasmic sperm injection (ICSI) because this procedure bypasses multiple mechanisms, which are apparently redundant, that have evolved to ensure selection of high-quality sperm cells for fertilization.

Recently the presence of endogenous nucleases that cleave spermatozoa DNA in mouse sperm has been reported; the nucleases can be activated by freeze-thawing of the spermatozoa in media without cryoprotectant (Sotolongo et al, 2005). The presence of these nucleases may produce unexpected sperm DNA fragmentation during the *in vitro* incubation period prior to *in vitro* fertilization (IVF) or ICSI if some of the spermatozoa have damaged membranes and, as a consequence, reduce the efficiency of the technology or induce long-term undesirable effects. In a recent report, it was demonstrated that *in vitro* incubation of swim-up-selected human spermatozoa in human tubal fluid medium without the addition of external factors leads to a progressive increase in the percentage of male gametes with fragmented DNA (Muratori et al, 2003). To explain spontaneous DNA fragmentation during *in vitro* sperm incubation, Maione et al (1997) postulated the involvement of sperm endogenous endonuclease activity. These authors reported that a particular nuclease activity is present in mature sperm. Subsequently, Ward and Ward (2004) hypothesized that the spontaneous DNA degradation within the sperm nucleus could be due to the enzymatic activity of endonucleases released from sperm with plasma membrane damage. Concomitantly, supporting evidence was reported of the existence of an endogenous nuclease in hamster, mouse, and human spermatozoa that cleaves DNA into loop-sized fragments (Sotolongo et al, 2005).

Our aims in this study were to evaluate if factors released from membrane-fragmented spermatozoa can act in the process of sperm DNA degradation and to examine the consequences on embryo development after ICSI with spermatozoa exposed to these factors. To achieve these goals, viability and DNA integrity of the sperm samples (levels of DNA fragmentation) were evaluated; ICSI was performed with sperm samples showing different levels of DNA fragmentation, and the subsequent development, implantation, and offspring obtained were analyzed.

## Materials and Methods

### *Reagents and Media*

All chemicals and media were purchased from Sigma Chemical Co (Madrid, Spain) unless otherwise stated.

### *Animals*

Hybrid B6D2F1 mice (Harlan Iberica SL, Barcelona, Spain) were used as gamete donors. Females were 6 to 8 weeks old at the time of the experiments, and males were at least 2 months old. CD1 females were used as surrogate mothers for embryo transfer experiments after they were mated with vasectomized CD1 males. Mice were fed *ad libitum* with a standard diet and maintained in a temperature- and light-controlled room (23°C; 14 hours light:10 hours dark). All animal experiments were approved by the institutional review board of the Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria according to the Guide for Care and Use of Laboratory Animals as adopted by the Society for the Study of Reproduction.

### *Preparation of Spermatozoa*

To obtain the sperm cells, B6D2 10- to 12-week-old male mice were killed by cervical dislocation. Cauda epididymides and vasa deferentia were placed in 500  $\mu$ L of M2 medium, and adipose tissue and blood vessels were removed. Then clean structures were placed in a new 1-mL drop of M2 medium covered with mineral oil (Sigma) in which spermatozoa were collected. Concentrations were determined with a Bürker hemocytometer. Four incubation conditions were assayed: 1) spermatozoa were analyzed immediately after collection (no incubation), 2) spermatozoa were incubated for 90 minutes in M2 medium, 3) spermatozoa were incubated for 90 minutes in conditioned medium (CM; medium that contained the different factors that spermatozoa release when their membranes are damaged), and 4) spermatozoa were incubated for 90 minutes in CM in the presence of 0.05 M EDTA, an ion chelator.

*Preparation of CM*—Spermatozoa collected from epididymides and vasa deferentia of B6D2 male mice were placed in 1-mL drops of M2 medium, sperm concentrations were determined with a Bürker hemocytometer, and samples were diluted if necessary to obtain final concentrations of  $10 \times 10^6$  spermatozoa/mL. Sperm samples were placed into 1.5-mL tubes, frozen 3 times by plunging the tubes directly into liquid nitrogen in the absence of cryoprotectants, thawed at room temperature, incubated for 120 minutes at room temperature, and then centrifuged at  $9300 \times g$  for 3 minutes to obtain a supernatant free of spermatozoa debris. This supernatant is what we called CM.

*Incubation in CM*—The incubation in CM was performed by adding 15  $\mu$ L of fresh sperm into 300  $\mu$ L of CM, followed by incubation for 90 minutes at room temperature.

*Preparation of CM with 0.05 M EDTA*—CM with 0.05 M EDTA was prepared as previously described, but in this case, M2 was modified by adding 25 mL of a 0.5 M solution of EDTA to 225 mL of M2 medium and reducing the concentration of NaCl to obtain a 285 to 295 mOsm medium (pH = 7.6). Incubation in CM with 0.05 M EDTA was performed as previously described for the incubation in CM.

In all sperm samples, we analyzed the percentage of viable spermatozoa and spermatozoa with DNA strand breaks according to the protocols described in the following sections.

### *Viability Assessment of Spermatozoa*

Percentages of living and dead sperm cells were assessed using the staining protocol of live/dead sperm viability kit (Molecular Probes, Eugene, Ore) (Madrid-Bury et al, 2005). Briefly, 0.8  $\mu$ L of a 20  $\mu$ M SYBR-14 working solution and 1.2  $\mu$ L of a 2.4 mM propidium iodide (PI) working solution were added to 50  $\mu$ L of the sperm suspension ( $2\text{--}3 \times 10^6$  sperm cells/mL) and incubated at 37°C for 15 minutes. After that time, 20  $\mu$ L of the sperm suspension was loaded on a glass slide, covered with a coverslip, and observed immediately under a fluorescent microscope equipped with the appropriate filters. The SYBR-14 stained the nucleus of living sperm green, whereas dead or membrane-damaged spermatozoa were stained red by PI, a conventional dead cell nucleic acid stain (Garner and Johnson, 1995). At least 500 cells were counted for each treatment.

### *Determination of DNA Fragmentation in Mouse Sperm Cells*

Gelled aliquots of 1% low melting point agarose in microfuge tubes were placed in a water bath at 90°C to 100°C for 5 minutes to melt the agarose and then transferred into a water bath at 37°C; after a 5-minute incubation for temperature equilibration at 37°C, 30  $\mu$ L of the sperm sample was mixed with agarose (to obtain a 0.7% final agarose concentration). Twenty microliters of the sperm-agarose mixture was then pipetted onto glass slides precoated with 0.65% standard agarose, previously dried at 80°C, and covered with a 22  $\times$  22 mm coverslip. The slide was placed on a cold plate in the refrigerator at 4°C for 5 minutes to allow the agarose to produce a microgel with the sperm cells trapped within. The coverslips were gently removed and the slide immediately immersed horizontally in 10 mL of a solution that contained 4%  $\beta$ -mercaptoethanol (Sigma) and 0.05% Triton X-100 (Sigma) in phosphate-buffered saline (PBS) to remove membranes and reduce protamine-SS to -SH. After the slides were washed for 5 minutes with PBS, osmotic shock was induced by placing the slides in a 1 M NaCl solution for 3 minutes. After the slides were washed in PBS for a further 5 minutes, they were placed in a 4% formaldehyde fixative solution for 30 minutes. Single- and double-strand DNA breaks were evaluated by the terminal deoxynucleotidyl transferase biotin-dUTP nick end labeling (TUNEL) assay using the In Situ Cell Death Detection Kit (Roche, Mannheim, Germany) as described by Pérez-Crespo et al (2006). Slides were rinsed twice in PBS and counterstained with 2  $\mu$ g/mL 4,6 diamidino-2-phenylindole (DAPI) in Vectashield (Vector, Burlingame, Calif). Negative controls lacking the TdT enzyme were run in each replicate. A minimum of 500 spermatozoa per sample were scored under the 40 $\times$  objective of the fluorescence microscope (Nikon, Tokyo, Japan). The number of spermatozoa per field stained with DAPI (blue) was first counted, and then the number of cells emitting green fluorescence (TUNEL positive) was estimated; numbers were expressed as percentages of the total cell count of the sample.

### *Oocyte Collection, ICSI, Embryo Culture, and Transfer*

Meiosis II oocytes were collected 14 hours posthuman chorionic gonadotropin (hCG) administration from 6- to 8-week-old female mice superovulated with 5 IU of equine chorionic gonadotropin (Intervet, Boxmeer, The Netherlands), followed 48 hours later by an equivalent dose of hCG (Lepori, Farma-Lepori, Barcelona, Spain). Cumulus cells were dispersed by a 3- to 5-min incubation in M2 medium containing 350 IU/mL hyaluronidase, and oocytes were washed and maintained in potassium-modified simplex optimized medium (KSOM) at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> air atmosphere until use.

Fresh sperm samples (no incubation) and sperm samples incubated for 90 minutes in CM, collected from 8 B6D2 mice, were used to perform ICSI. All samples were centrifuged at 135  $\times$  g for 3 minutes; in every sample, the supernatant was removed and the pellet was resuspended in 300  $\mu$ L of M2 medium. One volume of mouse sperm sample was mixed with 5 of M2 containing 10% polyvinyl-pyrrolidone (PVP) to decrease stickiness. ICSI was performed as described (Moreira et al, 2004; Moreira et al, 2007). Briefly, ICSI was performed in M2 medium at room temperature. The ICSI dish contained a manipulation drop (M2 medium), a sperm drop (sperm solution in M2/10% PVP), and an M2/10% PVP needle-cleaning drop. Injections were performed with a PMM-150 FU piezo-impact unit (PrimeTech, Tokyo, Japan) and Eppendorf micromanipulators (Hamburg, Germany) using a blunt-ended mercury-containing pipette with 6 to 7  $\mu$ m of inner diameter. The head of the fresh sperm cell was separated from the midpiece and tail by applying 1 or more piezoelectric pulses. Groups of 10 oocytes were injected with individual sperm heads. After 15 minutes of recovery at room temperature in M2 medium, surviving oocytes were washed 3 times in equilibrated KSOM and returned to mineral oil-covered KSOM drops and cultured at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> air atmosphere.

Embryos were cultured in vitro until either the 2-cell stage (24 hours later) or the blastocyst stage (96 hours later) and then transferred into oviducts of pseudopregnant recipient females. Embryo transfer was performed as described previously (Gutiérrez-Adán et al, 2001). To be able to collect data on the total number of implantations, recipients were sacrificed on day 14, and both the number of fetuses and resorptions were recorded.

### *Statistical Analysis*

Percentages of viable and TUNEL+ spermatozoa were compared by 1-way repeated-measures analysis of variance (followed by multiple pairwise comparisons using the Student-Newman-Kleus method). To normalize the percentage data, arcsin square root quick transform was applied to the percentages of TUNEL+ spermatozoa. The implantation rates and percentages of fetuses were compared using the *z*-test. All the statistical analyses described were performed using SigmaStat (Jandel Scientific, San Rafael, Calif) software.



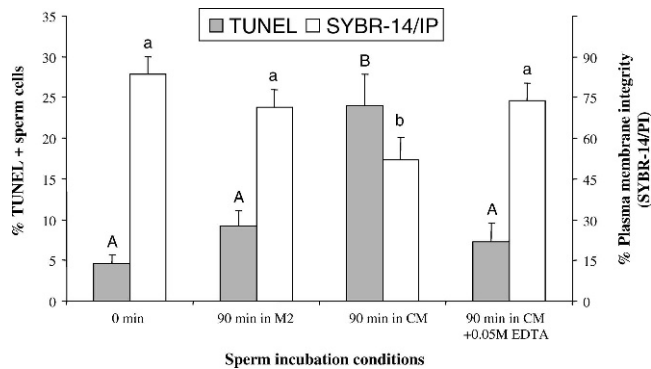


Figure 1. Percentage of DNA integrity assessed by terminal deoxynucleotidyl transferase biotin-dUTP nick end labeling (TUNEL) and percentage of spermatozoa with plasma membrane integrity assessed by SYBR-14/propidium iodide in spermatozoa samples subjected to different incubation conditions collected from epididymides and cauda deferentia of 7 B6D2 male mice. (A, B) Significant differences in the percentage of TUNEL-positive cells. a, b indicates significant differences in the percentage of spermatozoa with membrane integrity (by 1-way analysis of variance;  $P < .05$ ).

## Results

### Preincubation of Epididymal Spermatozoa in CM Compromises the Plasma Membrane and DNA Integrity of Spermatozoa

The functional membrane integrity of sperm cells was tested by the SYBR-14/PI assay. After 90 minutes of incubation in M2 medium, plasma membrane integrity values were similar to fresh sperm (Figure 1); however, after 90 minutes of incubation in CM, the percentage of cells with intact plasma membranes was reduced. However, our data showed that the presence of EDTA was able to block the detrimental effect of any agent present in the CM because viability values in this group (90 minutes in CM + EDTA) were similar to those observed with fresh spermatozoa and with M2-incubated spermatozoa (Figure 1).

The results of DNA damage, detected by TUNEL, are illustrated in Figure 1. When sperm cells were incubated for 90 minutes in M2 medium, no significant

increase in the proportion of DFS was detected. However, when sperm cells were incubated for 90 minutes in CM, a significant increase in DFS was observed. When spermatozoa were incubated in CM but in the presence of 0.05 M EDTA, no signs of increased DNA damage were evident, suggesting that the substances responsible for inducing DNA fragmentation in the spermatozoa are dependent on ions.

### Preimplantation and Postimplantation Development of Mouse Embryos Produced by ICSI

To perform ICSI, we used either fresh spermatozoa or spermatozoa that had been incubated for 90 minutes in CM. Embryos produced by ICSI were transferred either at the 2-cell stage or as blastocysts after in vitro culture. Cleavage rates, embryo development, and implantation rates of the embryos produced by ICSI are shown in the Table. We did not find any significant differences in the embryo developmental rate or morphology during the in vitro culture period, indicating that both cleavage rate and blastocyst yield were not affected by the incubation of spermatozoa with CM. However, the implantation rate of embryos (either 2 cells or blastocysts) resulting from ICSI with CM-pretreated sperm, was significantly reduced compared with those produced with fresh sperm ( $z$ -test;  $P < .05$ ) (Table). Moreover, the significantly reduced implantation rate of blastocysts produced by sperm pretreated with CM, which is lower than in any other group, suggests a cumulative negative effect of ICSI with DFS and in vitro culture.

The recording of the number of day 14 fetuses represented the number of embryos that developed to term, and the number of resorptions gave us information about the number of postimplantation losses (embryos that were able to implant but could not develop to term). It is expected that natural selection ensures that most embryos with genetic damage will abort before growing to term. When we analyzed postimplantation development, we found that independently of sperm pretreatment, the in vitro culture

Table. Effect of sperm pretreatment on fertilization, in vitro culture to blastocysts, and implantation after ICSI in B6D2 mice\*

Sperm pretreatment	No. of injected oocytes (no. of sessions)	No. of surviving oocytes (%)	No. of 2-cell embryos (%)	No. of blastocysts (%)	Embryo stage, no. transferred		No. of implantations (%)
					2-cell	Blastocyst	
No incubation	59 (2)	49 (83)	47 (96)	—	47		32 (68)†
90 min in CM	75 (2)	54 (72)	49 (91)	—	49		24 (49)‡
No incubation	57 (2)	57 (100)	53 (93)	26 (49)		26	14 (54)†‡
90 min in CM	85 (2)	70 (82)	64 (91)	28 (44)		28	6 (21)§

\* CM indicates conditioned medium; ICSI, intracytoplasmic sperm injection.

† vs ‡  $P = .042$  ( $z$ -test;  $P < .05$ ).

‡ vs §  $P \leq .001$  ( $z$ -test;  $P < .05$ ).

† vs §  $P \leq .001$  ( $z$ -test;  $P < .05$ ).

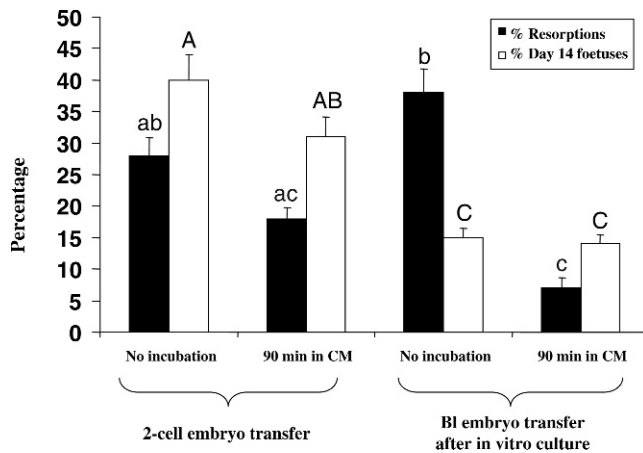


Figure 2. Effect of in vitro culture on the percentage of live fetuses and resorptions obtained after intracytoplasmic sperm injection. Values with different superscripts are statistically different among live fetuses (capital letters) or resorptions (lowercase letters) (z-test;  $P < .05$ ).

significantly affected the percentage of fetuses obtained at day 14 of development (Figure 2). Moreover, we found a nonsignificant reduction in the percentage of fetuses at day 14 in the group of embryos resulting from ICSI with CM-pretreated sperm compared with fresh sperm when embryos were transferred at the 2-cell stage. Also, when embryos were cultured in vitro before embryo transfer, the number of resorptions was higher in the group of fresh sperm than in the group incubated with CM. This suggests that the in vitro culture reduced the implantation rate of embryos generated with fragmented DNA, whereas the negative effect of in vitro culture in the ICSI embryos fertilized with fresh sperm is observed later, during fetal development.

## Discussion

The results presented here demonstrate that incubation of spermatozoa with factors released from membrane-damaged spermatozoa (probably due to endogenous sperm nucleases) leads to an increase in the proportion of DFS and that even though ICSI fertilization with these cells did not affect the percentage of blastocysts produced, it had adverse effects on embryo implantation and fetal development, suggesting an undesirable effect on embryo quality. In addition, we confirmed that in vitro culture conditions significantly reduced the viability of embryos fertilized by ICSI. It is important to understand the effects of these nucleases because of their implication in reproductive biology and in the clinical manipulation of spermatozoa in assisted reproductive technologies (ART).

One possible explanation to explain spontaneous DNA fragmentation during in vitro sperm incubation

is the involvement of sperm endonuclease activity. We found that there was a significant increase in the amount of DFS in CM (Figure 1). This is in agreement with the described presence of endogenous nucleases in mouse sperm, and it has been reported also in hamster and human spermatozoa (Sotolongo et al, 2005). These authors reported that mammalian spermatozoa can cleave DNA into loop-sized fragments. Recently it was reported by this group that mature mouse spermatozoa contain an active topoisomerase IIB (TOP2B) that regulates DNA degradation in association with an extracellular nuclease (Shaman et al, 2006; Yamauchi et al, 2007). They suggest the possibility that TOP2B and nuclease might be part of an apoptotic mechanism in the sperm cell; another possibility, not mutually exclusive, is that TOP2B can play a role in normal embryogenesis and that the major function of the nuclease may be to serve a protective role by digesting exogenous DNA. Other authors (Maione et al, 1997) also reported that a particular nuclease activity is present in mature sperm. Several studies have pointed out a detrimental effect of long-term incubation on sperm DNA fragmentation. In vitro incubation of swim-up-selected human spermatozoa resulted in a progressive increase in the percentage of DFS (Muratori et al, 2003). Also, an increased percentage of DFS assessed by the sperm chromatin structure assay was found in mammalian sperm incubated in vitro for a long time (Estop et al, 1993). Likewise, we observed an increase in DFS when spermatozoa were incubated for 90 minutes in CM. This effect was only evident when cultures took place in CM because spermatozoa incubated for 90 minutes in M2 medium showed fragmentation values similar to fresh semen. The agents present in CM responsible for this adverse effect could be inactivated because DFS levels returned to values similar to fresh semen when spermatozoa were incubated in CM but in the presence of EDTA. Previous reports have indicated that the presence of EDTA and the absence of  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  in sperm media improve chromosome stability (Kuretake et al, 1996; Tateno et al, 2000). Sperm DNA damage is prevented by EDTA, confirming that some enzymes requiring  $\text{Mg}^{2+}$  and  $\text{Ca}^{2+}$ , such as endonucleases, may be involved in the DNA degradation mechanism (Szczygiel and Ward, 2002).

The fact that sperm DNA fragmentation did not affect fertilization rates but could affect implantation and postimplantation development has been reported by other authors (Ahmadi and Ng, 1999b; Seli et al, 2004; Tesarik et al, 2004; Zini et al, 2005; Borini et al, 2006). In agreement with these authors, we did not observe a relationship between sperm DNA damage and fertilization rates. Also, we have not found evidence of a deleterious effect of DFS on in vitro embryo

development and morphology, in contrast with other studies, in which a negative correlation between sperm DNA fragmentation and blastocyst development after IVF or ICSI has been found (Ahmadi and Ng, 1999b; Seli et al, 2004; Virro et al, 2004; Fatehi et al, 2006). One possible explanation for this discordance might be differences in the source of DNA damage; these authors used x- or gamma-irradiated sperm or sperm from infertile men. However, we have found a negative correlation between the percentage of DFS and the implantation and postimplantation development, indicating a reduced quality of embryos. Even the embryonic genome in mice is activated early in development—the transcription activity of the blastocysts is higher than that detected in the earlier preimplantation stage, and at this stage the paternal genome plays a significant contributory role in embryo function; it is then when consequences of paternal DNA alterations may become manifest, impairing embryo implantation. In concordance with our results, other authors have observed a relationship between DNA fragmentation and implantation (Moskovtsev et al, 2005; Borini et al, 2006). We observed a reduced implantation rate in those groups in which embryos were cultured in vitro to the blastocyst stage, suggesting a negative relationship between ICSI and in vitro culture. This negative effect has been previously reported (Arny et al, 1987; Van der Auwera et al, 1999; Khosla et al, 2001a; Khosla et al, 2001b; Fernández-Gonzalez et al, 2004; Pérez-Crespo et al, 2005), and it questions the convenience of culturing embryos to the blastocyst stage to allow the selection of chromosomally competent embryos that has been proposed by other authors (Sakkas, 1999).

Incubation of the spermatozoa in CM is not a situation that can occur in human fertility clinics; however, a similar mechanism to what we observed can take place when spermatozoa are incubated before injection, especially in samples in which the DFS population is high. It is important to point out that we have observed an increase in the percentage of DFS after only 90 minutes of incubation; this means that long incubations are not necessarily required to increase the DFS percentage in sperm samples. Our data demonstrate that there are factors released from membrane-fragmented spermatozoa capable of inducing DNA fragmentation of intact sperm and therefore significantly reducing the implantation rate and fetal development. Evaluation of spermatozoa DNA fragmentation may prove to be useful to predict implantation rates. If our observations in the mouse can be extrapolated to humans, then our results strongly recommend that ART clinicians should inject sperm without delay to protect the sperm DNA and consequently to decrease the risk of passing damaged

information to the offspring, especially if we take into consideration that susceptibility to sperm DNA damage is higher in infertile than in fertile men (Sergeie et al, 2005). Further studies must be carried out to develop techniques that allow us to reduce DNA fragmentation levels in sperm samples used to perform ART.

## References

- Ahmadi A, Ng SC. Developmental capacity of damaged spermatozoa. *Hum Reprod.* 1999a;14:2279–2285.
- Ahmadi A, Ng SC. Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa. *J Exp Zool.* 1999b;284:696–704.
- Aitken RJ. Founders' Lecture. Human spermatozoa: fruits of creation, seeds of doubt. *Reprod Fertil Dev.* 2004;16:655–664.
- Aitken RJ, Baker MA. Oxidative stress, sperm survival and fertility control. *Mol Cell Endocrinol.* 2006;250:66–69.
- Aitken RJ, Baker MA, Sawyer D. Oxidative stress in the male germ line and its role in the aetiology of male infertility and genetic disease. *Reprod Biomed Online.* 2003;7:65–70.
- Arnon J, Meirou D, Lewis-Roness H, Ornoy A. Genetic and teratogenic effects of cancer treatments on gametes and embryos. *Hum Reprod Update.* 2001;7:394–403.
- Arny M, Nachtigall L, Quagliarello J. The effect of preimplantation culture conditions on murine embryo implantation and fetal development. *Fertil Steril.* 1987;48:861–865.
- Baker MA, Aitken RJ. Reactive oxygen species in spermatozoa: methods for monitoring and significance for the origins of genetic disease and infertility. *Reprod Biol Endocrinol.* 2005;3:67.
- Borini A, Tarozzi N, Bizzaro D, Bonu MA, Fava L, Flamigni C, Coticchio G. Sperm DNA fragmentation: paternal effect on early post-implantation embryo development in ART. *Hum Reprod.* 2006;21:2876–2881.
- Braude P, Bolton V, Moore S. Human gene expression first occurs between the four- and eight-cell stages of preimplantation development. *Nature.* 1988;332:459–461.
- Bungum M, Humaidan P, Spano M, Jepsen K, Bungum L, Giwercman A. The predictive value of sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters for the outcome of intrauterine insemination, IVF and ICSI. *Hum Reprod.* 2004;19:1401–1408.
- Carrell DT, Liu L, Peterson CM, Jones KP, Hatasaka HH, Erickson L, Campbell B. Sperm DNA fragmentation is increased in couples with unexplained recurrent pregnancy loss. *Arch Androl.* 2003a;49:49–55.
- Carrell DT, Wilcox AL, Lowy L, Peterson CM, Jones KP, Erickson L, Campbell B, Branch DW, Hatasaka HH. Elevated sperm chromosome aneuploidy and apoptosis in patients with unexplained recurrent pregnancy loss. *Obstet Gynecol.* 2003b;101:1229–1235.
- Chan PJ, Corselli JU, Patton WC, Jacobson JD, Chan SR, King A. A simple comet assay for archived sperm correlates DNA fragmentation to reduced hyperactivation and penetration of zona-free hamster oocytes. *Fertil Steril.* 2001;75:186–192.
- Estop AM, Munne S, Jost LK, Evenson DP. Studies on sperm chromatin structure alterations and cytogenetic damage of mouse sperm following in vitro incubation. Studies on in vitro-incubated mouse sperm. *J Androl.* 1993;14:282–288.
- Fatehi AN, Bevers MM, Schoevers E, Roelen BA, Colenbrander B, Gadella BM. DNA damage in bovine sperm does not block fertilization and early embryonic development but induces apoptosis after the first cleavages. *J Androl.* 2006;27:176–188.

- Fernández-Gonzalez R, Moreira P, Bilbao A, Jiménez A, Pérez-Crespo M, Ramirez MA, Rodriguez De Fonseca F, Pintado B, Gutiérrez-Adán A. Long-term effect of in vitro culture of mouse embryos with serum on mRNA expression of imprinting genes, development, and behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:5880–5885.
- Filatov MV, Semenova EV, Vorob'eva OA, Leont'eva OA, Drobchenko EA. Relationship between abnormal sperm chromatin packing and IVF results. *Mol Hum Reprod*. 1999;5:825–830.
- Garner DL, Johnson LA. Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide. *Biol Reprod*. 1995;53:276–284.
- Genesca A, Caballin MR, Miro R, Benet J, Germa JR, Egozcue J. Repair of human sperm chromosome aberrations in the hamster egg. *Hum Genet*. 1992;89:181–186.
- Gutiérrez-Adán A, Granados J, Pintado B, De La Fuente J. Influence of glucose on the sex ratio of bovine IVM/IVF embryos cultured in vitro. *Reprod Fertil Dev*. 2001;13:361–365.
- Hales BF, Aguilar-Mahecha A, Robaire B. The stress response in gametes and embryos after paternal chemical exposures. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2005;207:514–520.
- Irvine DS, Twigg JP, Gordon EL, Fulton N, Milne PA, Aitken RJ. DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. *J Androl*. 2000;21:33–44.
- Ji BT, Shu XO, Linet MS, Zheng W, Wacholder S, Gao YT, Ying DM, Jin F. Paternal cigarette smoking and the risk of childhood cancer among offspring of nonsmoking mothers. *J Natl Cancer Inst*. 1997;89:238–244.
- Khosla S, Dean W, Brown D, Reik W, Feil R. Culture of preimplantation mouse embryos affects fetal development and the expression of imprinted genes. *Biol Reprod*. 2001a;64:918–926.
- Khosla S, Dean W, Reik W, Feil R. Culture of preimplantation embryos and its long-term effects on gene expression and phenotype. *Hum Reprod Update*. 2001b;7:419–427.
- Kodama H, Yamaguchi R, Fukuda J, Kasai H, Tanaka T. Increased oxidative deoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients. *Fertil Steril*. 1997;68:519–524.
- Kuretake S, Kimura Y, Hoshi K, Yanagimachi R. Fertilization and development of mouse oocytes injected with isolated sperm heads. *Biol Reprod*. 1996;55:789–795.
- Madrid-Bury N, Pérez-Gutiérrez JF, Pérez-Garnelo S, Moreira P, Pintado Sanjuanbenito B, Gutiérrez-Adán A, de la Fuente Martínez J. Relationship between non-return rate and chromatin condensation of deep frozen bull spermatozoa. *Theriogenology*. 2005;64:232–241.
- Maione B, Pittoggi C, Achene L, Lorenzini R, Spadafora C. Activation of endogenous nucleases in mature sperm cells upon interaction with exogenous DNA. *DNA Cell Biol*. 1997;16:1087–1097.
- Marchetti F, Wyrobek AJ. Mechanisms and consequences of paternally-transmitted chromosomal abnormalities. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 2005;75:112–129.
- Matsuda Y, Tobari I. Repair capacity of fertilized mouse eggs for x-ray damage induced in sperm and mature oocytes. *Mutat Res*. 1989;210:35–47.
- McVicar CM, McClure N, Williamson K, Dalzell LH, Lewis SE. Incidence of Fas positivity and deoxyribonucleic acid double-stranded breaks in human ejaculated sperm. *Fertil Steril*. 2004;81(suppl 1):767–774.
- Menezes YJ. Paternal and maternal factors in preimplantation embryogenesis: interaction with the biochemical environment. *Reprod Biomed Online*. 2006;12:616–621.
- Moreira PN, Giraldo P, Cozar P, Pozueta J, Jiménez A, Montoliu L, Gutiérrez-Adán A. Efficient generation of transgenic mice with intact yeast artificial chromosomes by intracytoplasmic sperm injection. *Biol Reprod*. 2004;71:1943–1947.
- Moreira PN, Pérez-Crespo M, Ramirez MA, Pozueta J, Montoliu L, Gutiérrez-Adán A. Effect of transgene concentration, flanking matrix attachment regions, and RecA-coating on the efficiency of mouse transgenesis mediated by intracytoplasmic sperm injection. *Biol Reprod*. 2007;76:336–343.
- Morris ID. Sperm DNA damage and cancer treatment. *Int J Androl*. 2002;5:255–261.
- Moskovtsev SI, Willis J, Azad A, Mullen JB. Sperm DNA integrity: correlation with sperm plasma membrane integrity in semen evaluated for male infertility. *Arch Androl*. 2005;51:33–40.
- Muratori M, Maggi M, Spinelli S, Filimberti E, Forti G, Baldi E. Spontaneous DNA fragmentation in swim-up selected human spermatozoa during long term incubation. *J Androl*. 2003;24:253–262.
- Pérez-Crespo M, Pericuesta E, Rey R, Gutiérrez-Adán A. OC6 Scrotal heat stress in mice affects viability and DNA integrity of sperm, and sex ratio of the offspring. *Reprod Domest Anim*. 2006;41(suppl 2):104.
- Pérez-Crespo M, Ramirez MA, Fernández-González R, Rizo D, Lonergan P, Pintado B, Gutiérrez-Adán A. Differential sensitivity of male and female mouse embryos to oxidative induced heat-stress is mediated by glucose-6-phosphate dehydrogenase gene expression. *Mol Reprod Dev*. 2005;72:502–510.
- Sakkas D. The use of blastocyst culture to avoid inheritance of an abnormal paternal genome after ICSI. *Hum Reprod*. 1999;14:4–5.
- Sakkas D, Urner F, Bizzaro D, Manicardi G, Bianchi PG, Shoukir Y, Campana A. Sperm nuclear DNA damage and altered chromatin structure: effect on fertilization and embryo development. *Hum Reprod*. 1998;13(suppl 4):11–19.
- Saleh RA, Agarwal A, Nada EA, El-Tonsy MH, Sharma RK, Meyer A, Nelson DR, Thomas AJ. Negative effects of increased sperm DNA damage in relation to seminal oxidative stress in men with idiopathic and male factor infertility. *Fertil Steril*. 2003;79(suppl 3):1597–1605.
- Seli E, Gardner DK, Schoolcraft WB, Moffatt O, Sakkas D. Extent of nuclear DNA damage in ejaculated spermatozoa impacts on blastocyst development after in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 2004;82:378–383.
- Sergerie M, Laforest G, Bujan L, Bissonnette F, Bleau G. Sperm DNA fragmentation: threshold value in male fertility. *Hum Reprod*. 2005;20:3446–3451.
- Shaman JA, Prisztoka R, Ward WS. Topoisomerase IIB and an extracellular nuclease interact to digest sperm DNA in an apoptotic-like manner. *Biol Reprod*. 2006;75:741–748.
- Shimura T, Inoue M, Taga M, Shiraishi K, Uematsu N, Takei N, Yuan ZM, Shinohara T, Niwa O. p53-dependent S-phase damage checkpoint and pronuclear cross talk in mouse zygotes with X-irradiated sperm. *Mol Cell Biol*. 2002a;22:2220–2228.
- Shimura T, Toyoshima M, Taga M, Shiraishi K, Uematsu N, Inoue M, Niwa O. The novel surveillance mechanism of the Trp53-dependent S-phase checkpoint ensures chromosome damage repair and preimplantation-stage development of mouse embryos fertilized with x-irradiated sperm. *Radiat Res*. 2002b;158:735–742.
- Sotolongo B, Huang TT, Isenberger E, Ward WS. An endogenous nuclease in hamster, mouse, and human spermatozoa cleaves DNA into loop-sized fragments. *J Androl*. 2005;26:272–280.
- Sun JG, Jurisicova A, Casper RF. Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro. *Biol Reprod*. 1997;56:602–607.
- Szczygiel MA, Ward WS. Combination of dithiothreitol and detergent treatment of spermatozoa causes paternal chromosomal damage. *Biol Reprod*. 2002;67:1532–1537.

- Tateno H, Kimura Y, Yanagimachi R. Sonication per se is not as deleterious to sperm chromosomes as previously inferred. *Biol Reprod.* 2000;63:341–346.
- Tesarik J, Greco E, Mendoza C. Late, but not early, paternal effect on human embryo development is related to sperm DNA fragmentation. *Hum Reprod.* 2004;19:611–615.
- Tesarik J, Mendoza C, Greco E. Paternal effects acting during the first cell cycle of human preimplantation development after ICSI. *Hum Reprod.* 2002;17:184–189.
- Tomlinson MJ, Moffatt O, Manicardi GC, Bizzaro D, Afnan M, Sakkas D. Interrelationships between seminal parameters and sperm nuclear DNA damage before and after density gradient centrifugation: implications for assisted conception. *Hum Reprod.* 2001;16:2160–2165.
- Van der Auwera I, Pijnenborg R, Koninckx PR. The influence of in vitro culture versus stimulated and untreated oviductal environment on mouse embryo development and implantation. *Hum Reprod.* 1999;14:2570–2574.
- Virro MR, Larson-Cook KL, Evenson DP. Sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters are related to fertilization, blastocyst development, and ongoing pregnancy in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertil Steril.* 2004;81:1289–1295.
- Ward MA, Ward WS. A model for the function of sperm DNA degradation. *Reprod Fertil Dev.* 2004;16:547–554.
- Yamauchi Y, Shaman JA, Ward WS. Topoisomerase II-mediated breaks in spermatozoa cause the specific degradation of paternal DNA in fertilized oocytes. *Biol Reprod.* 2007;76:666–672.
- Zenzes MT. Smoking and reproduction: gene damage to human gametes and embryos. *Hum Reprod Update.* 2000;6:122–131.
- Zheng P, Schramm RD, Latham KE. Developmental regulation and in vitro culture effects on expression of DNA repair and cell cycle checkpoint control genes in rhesus monkey oocytes and embryos. *Biol Reprod.* 2005;72:1359–1369.
- Zhu BK, Setchell BP. Effects of paternal heat stress on the in vivo development of preimplantation embryos in the mouse. *Reprod Nutr Dev.* 2004;44:617–629.
- Zini A, Meriano J, Kader K, Jarvi K, Laskin CA, Cadesky K. Potential adverse effect of sperm DNA damage on embryo quality after ICSI. *Hum Reprod.* 2005;20:3476–3480.

## DISCUSIÓN



Existe una preocupación creciente sobre la disminución de la fertilidad tanto en animales como en los seres humanos; esta disminución se atribuye a causas muy diversas, entre las que se encuentran aquellas de índole genética y las provocadas por agentes externos como ciertas sustancias tóxicas o condiciones ambientales adversas (revisado en Aitken, 1999; revisado en Aitken and Baker, 2006; Aitken *et al.* 2003; Aitken and De Iuliis, 2007; Franks *et al.* 2006; Krausz and Giachini, 2007). Esta tesis doctoral se ha centrado en dos factores que pueden afectar al desarrollo embrionario y fetal de los individuos: el estrés térmico y el daño nuclear espermático. El estrés térmico es un factor que adquirirá una mayor relevancia en el futuro si tenemos en cuenta las predicciones climáticas; éstas auguran un aumento de las temperaturas, que podría ocasionar consecuencias negativas sobre la fertilidad de los individuos, especialmente en aquellas especies más sensibles al estrés térmico. Por su parte, el daño nuclear espermático es también un factor muy importante en la fertilidad, ya que se ha indicado que cuando se sobrepasa un valor umbral de fragmentación del ADN espermático, se compromete el desarrollo embrionario y la implantación (Ahmadi and Ng, 1999a; Benchaib *et al.* 2003; Borini *et al.* 2006; Fatehi *et al.* 2006; Lewis and Aitken, 2005; Seli and Sakkas, 2005; Tesarik *et al.* 2004). Cada vez con más frecuencia se recurre a la realización de técnicas de reproducción asistida (TRA) para resolver los casos de infertilidad de los seres humanos, lo que nos obliga a ser capaces de identificar y clasificar las muestras seminales conforme al grado de daño nuclear que presenten.

Numerosos estudios han demostrado que ciertos defectos que aparecen en el desarrollo embrionario, fetal e incluso durante la edad adulta del individuo, tienen su origen en el ambiente al que se ven sometidos los embriones en estadio preimplantacional (Fernandez-Gonzalez *et al.* 2004; Fernandez-Gonzalez *et al.* 2007; revisado en Fleming *et al.* 2004; Kwong *et al.* 2000; Watkins *et al.* 2008). Por tanto, son muy importantes las condiciones de cultivo *in vitro*, así como las condiciones a las que se ven sometidos los embriones *in vivo*, tanto en el oviducto como en el útero. De acuerdo con estos estudios, se presentan las observaciones y resultados aportados en el primer capítulo experimental de esta tesis. En él se detalla cómo un factor ambiental, el estrés térmico, aplicado sobre embriones en estadios preimplantacionales, tanto en condiciones *in vitro* como *in vivo*, puede dar lugar a consecuencias negativas en el desarrollo fetal. Concretamente, dos de los efectos observados fueron la disminución de la tasa de implantación y la distorsión de la proporción de sexos en favor de las hembras. Sin embargo, debemos considerar que las anomalías detectadas en el desarrollo embrionario y fetal de un individuo no sólo tienen su origen en el ambiente al que se ven sometidos los embriones en los estadios preimplantacionales, sino que pueden tener su origen, entre otros, en alteraciones presentes en los gametos masculinos y/o femeninos (revisado en Menezo, 2006; revisado en Nanassy and Carrell, 2008; Tarin *et al.* 2000). Trabajos recientes apuntan como causa de varios de los defectos observados en el desarrollo fetal y postnatal, la menor integridad del ADN de los espermatozoides, ya que ésta es esencial para una correcta transmisión del material genético paterno (revisado en Agarwal and Allamaneni, 2004; Borini *et al.* 2006; Zini and Libman, 2006). En el segundo y en el tercer capítulo experimental de esta tesis se evaluaron las consecuencias reproductivas de la utilización de espermatozoides



con un elevado grado de fragmentación del ADN; concretamente, en el segundo capítulo se muestra la relación entre el estrés térmico escrotal y la fragmentación del ADN espermático y en el tercero se establece relación entre las condiciones de manipulación de espermatozoides y su influencia en el aumento de la fragmentación del ADN espermático.

En el primer trabajo experimental de esta tesis se planteó la hipótesis de que la mayor supervivencia de los embriones de sexo femenino ante situaciones de estrés térmico se relaciona con la existencia de una expresión diferencial de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (*G6pdx*) entre embriones de distinto sexo. *G6PD* es un gen ligado al cromosoma X (Chapman *et al.* 1976) y que tiene una mayor expresión en blastocistos de sexo femenino (Gutierrez-Adan *et al.* 2000; Jimenez *et al.* 2003b; Taylor *et al.* 2003; Wrenzycki *et al.* 2002). Observamos que bajo determinadas condiciones de estrés térmico (24h a 42°C *in vitro* ó 24 h a 35°C *in vivo*), los embriones de sexo femenino son más resistentes que los de sexo masculino, sin embargo, esta diferencia entre sexos sólo se observó en el estadio de mórula compactada (estudio *in vitro* e *in vivo*) y en el estadio de blastocisto (estudio *in vivo*). Varios autores han comprobado, que bajo situaciones estresantes, en las hembras gestantes de muchos mamíferos, incluidos los seres humanos, los embriones y fetos de sexo masculino muestran una mayor vulnerabilidad al estrés, ocasionando un descenso en el porcentaje esperado de individuos de sexo masculino en el momento del nacimiento (Hansen *et al.* 1999; James, 1998a; Pergament *et al.* 2002). Con el propósito de determinar qué mecanismos están implicados en el diferente comportamiento de los embriones de distinto sexo, y en qué momentos del desarrollo preimplantacional estas diferencias son más evidentes, se demostró que en blastocistos cultivados *in vitro*, el nivel de expresión de algunos genes autosómicos (*Sox*, *Bax*, *Oct-4*) era mayor en los embriones de sexo masculino que en los femeninos. Sin embargo, la expresión de *G6pdx*, gen ligado al cromosoma X, era mayor en los embriones de sexo femenino. La mayor expresión de *G6pdx* en los embriones de sexo femenino puede deberse a que, aunque se produce la inactivación del cromosoma X, algunos genes escapan a esta inactivación; *G6PD* es uno de esos genes que escapa a la inactivación del cromosoma X en los embriones femeninos de los seres humanos (Carrel and Willard, 1999). Por otra parte, podemos argumentar que las diferencias observadas se manifiestan a partir del estadio de mórula, porque es a partir de este estadio cuando la actividad transcripcional del embrión es mayor (Latham and Schultz, 2001) y cuando se producen diferencias entre embriones de sexo masculino y femenino en la expresión de ciertos genes (Kobayashi *et al.* 2006), entre ellos *G6pdx*. En estadios previos al estadio de mórula, se observó que el estrés térmico materno afectaba por igual a los embriones de sexo masculino y femenino.

Se ha publicado que son muchas las diferencias entre los embriones preimplantacionales de distinto sexo, diferencias en cuanto a la velocidad de desarrollo, la expresión génica y la regulación epigenética (Bermejo-Alvarez *et al.* 2008; revisado en Gutierrez-Adan *et al.* 2006b; Tarin *et al.* 2000). Apoyando nuestra hipótesis de trabajo, comprobamos que la enzima *G6PD* está involucrada en la diferente respuesta al estrés térmico por parte de embriones de distinto sexo ya que, tras su inhibición, las diferencias observadas entre embriones de distinto sexo desaparecían.

Otros autores han relacionado igualmente la actividad de G6PD con la diferente respuesta de los embriones de distinto sexo a situaciones estresantes; así pues, en embriones bovinos en estadio de mórula, se ha demostrado que la actividad de la enzima G6PD afecta considerablemente la capacidad de desarrollo de los embriones sometidos a una situación estresante de elevada presión parcial de oxígeno (Iwata, 2002); en este trabajo, bajo las condiciones estresantes descritas, los embriones de sexo femenino mostraron una mayor actividad enzimática de G6PD en el estadio de mórula que les confiería una mayor capacidad de desarrollo frente a los embriones de sexo masculino.

Proponemos que la enzima G6PD participa en la regulación oxidativa diferencial entre embriones de distinto sexo. Teniendo en cuenta que G6PD es una enzima productora de NADPH, activada en respuestas al estrés oxidativo (Filosa *et al.* 2003) y que a su vez, es indispensable en la protección celular frente al mismo (Nicol *et al.* 2000), se planteó la hipótesis de que los embriones de sexo femenino son más resistentes a situaciones estresantes gracias a que la mayor actividad de G6PD provoca una elevación de los niveles de NADPH; NADPH, a su vez, como antioxidante permite una mayor eliminación de radicales libres de oxígeno (RLO) (Rieger *et al.* 1992). El aumento de los niveles de NADPH podría provocar un incremento de la actividad de ciertos factores de transcripción que son regulados por el estado redox y que estén implicados en las diferencias en el desarrollo de embriones de distinto sexo (Harvey *et al.* 2002). Además, la diferente regulación oxidativa de los embriones de sexo masculino y femenino podría inducir otras diferencias fisiológicas entre embriones de distinto sexo y, por tanto, explicar muchas de las diferencias observadas durante los estadios tempranos de desarrollo (revisado en Gutierrez-Adan *et al.* 2006a). El hecho de que observemos diferencias entre embriones de distinto sexo respecto a la expresión de genes autosómicos puede ser una consecuencia de la expresión diferencial de genes presentes en el cromosoma X. Apoyando esta propuesta, otros autores han observado que la inhibición de G6PD en embriones bovinos elimina las diferencias existente entre machos y hembras respecto a la expresión del ARNm de interferón-tau, un gen autosómico (Kimura *et al.* 2004). Recientemente, nuestro grupo de trabajo ha publicado que existen diferencias epigenéticas entre blastocistos bovinos de distinto sexo producidos *in vitro* (Bermejo-Alvarez *et al.* 2008). Creemos que las diferencias en expresión génica entre embriones de distinto sexo descritas en el presente capítulo pueden ser consecuencia de las diferencias epigenéticas entre embriones de sexo masculino y femenino.

En el segundo trabajo experimental de esta tesis se demuestra que el estrés térmico escrotal provoca alteraciones en el proceso de espermatogénesis que se manifiestan en modificaciones de parámetros característicos de los espermatozoides recogidos en diferentes momentos tras el estrés. Concretamente, se observó un aumento del porcentaje de espermatozoides con ADN fragmentado; además, el efecto negativo del estrés térmico escrotal no se limitó a disminuir la calidad espermática de los individuos afectados, sino que, al igual que han observado otros autores con anterioridad (Jannes *et al.* 1998; Setchell *et al.* 1998; Paul *et al.* 2008), el desarrollo embrionario y fetal se vió afectado; en este caso, observamos, por una parte,

una distorsión de la proporción de sexos el mismo día del estrés térmico y, por otra, un menor número de fetos tras la monta natural de los machos 21 días después del estrés térmico.

Cuando se analizaron los parámetros espermáticos de los machos sometidos al estrés térmico escrotal, observamos que los espermatozoides presentaron distintos grados de alteración en su concentración, viabilidad, motilidad e integridad del ADN espermático, dependiendo del momento en el que estos animales fueron sometidos al estrés térmico. Este fenómeno indica que las células germinales presentes en el testículo y precursoras de los espermatozoides analizados, se ven afectadas de manera diferencial por el estrés térmico. Los resultados mostraron que los espermátocitos son el tipo celular más sensible al estrés térmico, tal y como habían propuesto otros autores (Banks *et al.* 2005; Paul *et al.* 2008; Yin *et al.* 1997). Además se confirma que la integridad del ADN espermático se ve muy comprometida al someter a los machos a estrés térmico escrotal (Banks *et al.* 2005; Paul *et al.* 2008; Sailer *et al.* 1997; Yin *et al.* 1997).

Independientemente del momento en el que se analizaran los espermatozoides, dentro del período comprendido entre 0 y 28 días después del estrés térmico, se observó un aumento del porcentaje de espermatozoides con ADN fragmentado con respecto al grupo control. Los espermatozoides recogidos el día 0 se encontraban en el epidídimo en el momento del estrés térmico y los espermatozoides recogidos entre 7 y 28 días después del estrés, probablemente se habrían originado a partir de células germinales presentes en el testículo en el momento del tratamiento. El mayor daño en el ADN espermático se observó en los espermatozoides recogidos 14 días después del tratamiento térmico. En base a la duración de la espermatogénesis murina descrita por Oakberg (1956) y Russell *et al.* (1990), la mayoría de estos espermatozoides provendrían de espermátidas en estadios 1-11. Se ha demostrado que durante el proceso normal de espermiogénesis, se producen roturas de la cadena de ADN en las espermátidas en estadios 9-11 y que estas roturas están asociadas con la condensación del ADN de las células germinales y con la sustitución de las histonas por protaminas (Marcon and Boissonneault, 2004). Esta conformación abierta de la cromatina junto con el hecho de que las espermátidas formadas a partir de los espermátocitos secundarios tienen una capacidad limitada de reparación del ADN (Sega, 1979; Sotomayor and Sega, 2000), parecen ser los causantes de la alta vulnerabilidad de las espermátidas a los efectos nocivos del calor. Cuando la población celular mayoritariamente afectada por el estrés térmico fue la de los espermátocitos, también observamos un aumento, respecto al control, en el porcentaje de espermatozoides con fragmentación de su ADN en las muestras espermáticas recogidas 21 y 28 días después del tratamiento; este hecho puede ser debido a que durante la profase meiótica, tiene lugar la reorganización del ADN en el núcleo de las células germinales en las fases de leptotene, zigotene y paquitene (Hess, 2007). En muchas de estas células, el daño que se produce en el ADN no puede ser reparado en su totalidad; sin embargo, estas células dañadas son capaces de proseguir su desarrollo y dar lugar a espermatozoides que alcanzan el epidídimo.

El porcentaje de espermatozoides TUNEL positivos observados en la muestra recogida entre el momento del estrés ("día 0") y 7 días después del mismo, es significativamente superior al obtenido en el grupo control, pero inferior al valor observado a los 14 días. En el grupo "día 0", las células afectadas fueron los espermatozoides presentes en el epididímo y en el grupo "día 7," la mayoría de las células afectadas probablemente fueran espermátidas elongadas o espermatozoides; por lo tanto, en ambos casos, en el núcleo de las células afectadas las protaminas están asociadas al ADN confiriendo al núcleo una estructura más compacta y, por ende, con más resistencia a la fragmentación inducida por el calor que la que presentan las espermátidas redondas o los espermatozoides (Ward and Coffey, 1991). A pesar de la mencionada compactación del ADN con las protaminas, los espermatozoides y las espermátidas elongadas son susceptibles a sufrir alteraciones en el ADN inducidas por el calor, tal y como ya habían observado anteriormente otros autores (Banks *et al.* 2005; Sailer *et al.* 1997).

Al evaluar cuáles fueron las consecuencias de la aplicación del estrés térmico escrotal sobre el desarrollo *in vivo* de los embriones y fetos concebidos por los machos sometidos al estrés, se observó que se producía una disminución en la tasa de implantación embrionaria cuando el apareamiento tenía lugar entre 21 y 28 días después del estrés térmico. Este descenso se producía únicamente en este momento, confirmando las observaciones de Rockett *et al.* (2001) y Paul *et al.* (2008b). Así mismo, las causas de este hecho podrían atribuirse a la subfertilidad de los machos o la existencia de una reducción de la calidad embrionaria. Nos inclinamos a pensar que la causa es la subfertilidad de los machos ya que, en este grupo, tanto la viabilidad como la motilidad espermática son inferiores a los valores observados en el resto de los grupos. Hay otros autores que han observado un descenso en la tasa de implantación de los embriones concebidos mediante monta natural de animales estresados térmicamente 7 ó 14 días antes del apareamiento (Yaeram *et al.* 2006) o sometidos a otro tipo de tratamiento que ocasionaba un aumento de la fragmentación del ADN, como los rayos  $\gamma$  (Marchetti *et al.* 2007); esta discrepancia con respecto a nuestros resultados puede deberse a que el daño espermático provocado es diferente; en el primero de los casos, por tratarse de una intensidad diferente de estrés térmico, y en el segundo, por ser diferente la fuente del daño espermático, en este caso la radiación podría presentar mecanismos de acción diferentes al estrés térmico, lo que ocasionaría la aparición de espermatozoides con distintos tipos de daño (Haines *et al.* 1998). A su vez, éstos, podrían ser seleccionados o no durante el transporte a lo largo de tracto reproductivo con la consiguiente selección espermática que allí podría tener lugar (revisado en Suarez, 2007). Además, se tiene que tener en cuenta la gran variabilidad de respuestas frente al estrés térmico entre individuos y cepas; nosotros hemos usado la cepa CD1 no endogámica, mientras que otros autores han usado cepas endogámicas, en las cuales la deriva génica puede afectar de distinta manera a la calidad espermática de las diferentes cepas; se ha descrito que los efectos del estrés térmico escrotal pueden variar enormemente, pudiendo provocar la infertilidad de los individuos, en los casos más extremos, o no ocasionando ningún efecto negativo apreciable como es el caso de los individuos que mantienen una excelente fertilidad tras ser sometidos al estrés térmico (Cammack *et al.* 2006).

Cuando se analizó si la proporción de sexos de la descendencia se veía alterada tras someter a los animales al estrés térmico escrotal, se observó una distorsión de la misma en favor de las hembras en las camadas resultantes del apareamiento de los machos pocas horas después de haber sido sometidos al estrés térmico escrotal. La causa principal de esta observación puede ser la situación de estrés oxidativo originada en el epidídimo tras el tratamiento (Jara *et al.* 2002; Seiler *et al.* 2000) y que provoca un entorno desfavorable que podría afectar de manera diferencial a la funcionalidad de los espermatozoides portadores del cromosoma X o del cromosoma Y. Los cambios inducidos por el estrés térmico en el epidídimo se producen durante un corto periodo de tiempo, lo que explicaría que cuando los machos se aparean 7, 14, 21, 28 y 60 días después del estrés térmico, no se observen diferencias en la proporción de sexos. Se considera que es la funcionalidad de los espermatozoides X e Y la que puede verse afectada de manera distinta por el estrés térmico y no el número de espermatozoides portadores de uno u otro cromosoma, ya que la proporción de espermatozoides portadores del cromosoma X e Y en el epidídimo, analizada mediante PCR cuantitativa (qPCR), es la esperada, 50:50, en todos los grupos experimentales, incluido el de 6 horas después del estrés térmico ("día 0"). A raíz de estas observaciones, planteamos la hipótesis de que exista una diferente respuesta de los espermatozoides portadores del cromosoma X o Y frente a determinadas situaciones de estrés oxidativo, pudiendo considerarse este diferente comportamiento entre espermatozoides portadores del cromosoma X e Y como un posible mecanismo pre-concepcional de modificación de la proporción de sexos de la descendencia. Gomendio *et al.* (2006) también observaron un mayor porcentaje de hembras en la descendencia de ciervos poco fértiles y en el caso de los animales más fértiles observaron un mayor porcentaje de machos. Estos autores proponen que las diferencias en la funcionalidad de los espermatozoides portadores del cromosoma X e Y pueden deberse a la expresión génica diferencial en los cromosomas sexuales (LaMunyon and Ward, 1997). Esta diferente expresión postmeiótica se ha sugerido recientemente (Wang *et al.* 2005) y podría influir en la funcionalidad, morfología y tamaño de los espermatozoides. Otros autores, (Viloria *et al.* 2005), han comprobado que los hombres fumadores tienen peor calidad espermática como consecuencia del estrés oxidativo al que están sometidos, observando además una distorsión de la proporción de sexos en su descendencia que se refleja en un mayor porcentaje de embriones de sexo femenino después de la realización de la fecundación *in vitro* con espermatozoides obtenidos tras realizar la técnica de swim-up a la muestra espermática. Estos autores, al igual que los resultados mostrados en esta tesis, observaron en el eyaculado que los porcentajes de espermatozoides portadores del cromosoma X o Y no se diferenciaban del valor esperado (50:50), sugiriendo que la técnica de swim-up espermática podría estar favoreciendo la selección de un mayor porcentaje de espermatozoides portadores del cromosoma X. La existencia de distorsión en la proporción de sexos en la descendencia de los machos que son sometidos al estrés térmico escrotal el mismo día de su apareamiento (día 0), sugiere que el efecto del estrés térmico sobre el epidídimo debe considerarse en futuras investigaciones. Aunque la mayoría de los autores proponen que el epidídimo es menos susceptible que el testículo al estrés térmico (Bedford, 1991), no hay que descartar un posible efecto negativo sobre los espermatozoides que están presentes en él,

contribuyendo a reducir la capacidad fecundante de los mismos, aunque conserven su motilidad. Igualmente, sería necesario llevar a cabo experimentos que valorasen si existe una diferente capacidad funcional entre espermatozoides portadores del cromosoma X e Y.

Con el objetivo de evaluar otro de los posibles mecanismos implicados en la degradación del ADN espermático se procedió a realizar el experimento que se presenta en el tercer capítulo experimental de esta tesis; en este trabajo, demostramos experimentalmente que existen factores, dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ , implicados en la fragmentación del ADN espermático y que son liberados por los espermatozoides que presentan su membrana plasmática deteriorada. La fecundación de ovocitos mediante ICSI utilizando estos espermatozoides no afectó ni al porcentaje ni a la morfología de los blastocistos obtenidos; sin embargo, ocasionó una disminución de la implantación embrionaria, hecho que nos lleva a pensar que puede existir un deterioro de la calidad embrionaria no reflejado en su morfología. Por tanto, la selección de los embriones basada en su morfología previo a su transferencia no puede ser considerada como un indicador de la calidad embrionaria totalmente fiable, si bien a menudo es el único disponible. Además, se confirma que las condiciones de cultivo *in vitro* reducen significativamente la viabilidad de los embriones, hecho que ya había sido observado anteriormente por otros investigadores (Arny *et al.* 1987; Fernandez-Gonzalez *et al.* 2004; Khosla *et al.* 2001a; Khosla *et al.* 2001b; Van der Auwera *et al.* 1999), concretamente, Zheng *et al.* (2005) comprobaron que el cultivo *in vitro* afecta a la expresión de genes reparadores del ADN en embriones en estadio de blastocisto, perjudicando su capacidad para reparar alteraciones en el ADN. Esta observación cuestiona la conveniencia propuesta por otros autores (Sakkas, 1999), de cultivar los embriones hasta el estadio de blastocisto para seleccionar los embriones que no presenten alteraciones cromosómicas.

Diferentes autores han apuntado que la participación paterna es esencial para regular y controlar el desarrollo de los embriones tempranos (revisado en Nanassy & Carrell, 2008). Igualmente, se ha observado que las anomalías espermáticas tienen repercusión en la calidad embrionaria (Acharyya *et al.* 2005; Cebesoy *et al.* 2006; Nasr-Esfahani *et al.* 2005; Zini *et al.* 2005). El hecho de que tras la utilización en la técnica de ICSI de espermatozoides con mayor grado de daño en el ADN espermático no se observara una disminución en la tasa de división, pero sí una menor tasa de implantación embrionaria, ha sido sugerida con anterioridad por otros autores (Ahmadi and Ng, 1999b; Borini *et al.* 2006; Seli *et al.* 2004; Tesarik *et al.* 2004; Zini *et al.* 2005). Nosotros no comprobamos alteraciones en la morfología embrionaria preimplantacional ni en el porcentaje de blastocistos obtenidos, resultados que contradicen lo observado por otros investigadores en embriones humanos, que han comprobado una correlación negativa entre la fragmentación del ADN espermático y el desarrollo hasta el estadio de blastocisto después de FIV o ICSI (Ahmadi and Ng, 1999b; Fatehi *et al.* 2006; Seli *et al.* 2004; Virro *et al.* 2004). Estas diferencias puede deberse al origen del daño en el ADN espermático. Aunque en el ratón, el genoma embrionario es activado en el estadio de dos células, la actividad transcripcional en los blastocistos es superior a la observada en etapas iniciales del desarrollo y es en este estadio

cuando el genoma paterno juega un papel significativo en el desarrollo del embrión (Latham and Schultz, 2001); teniendo en cuenta esta premisa, se observó un descenso en la tasa de implantación embrionaria, se cree que probablemente como consecuencia de las alteraciones en el ADN paternal. Los embriones en los primeros estadios de desarrollo disponen de varios mecanismos de reparación del ADN dañado (revisado en Jaroudi and SenGupta, 2007); sin embargo, en determinadas circunstancias la habilidad del embrión para reparar el daño en el ADN puede estar muy limitada (Harrouk *et al.* 2000; Zheng *et al.* 2005). Recientemente, se ha observado que entre las consecuencias negativas de la utilización de espermatozoides con daño en el ADN espermático se encuentran los cambios epigenéticos y genéticos durante el desarrollo preimplantacional así como alteraciones de la descendencia, tales como los defectos en el crecimiento, las alteraciones en el comportamiento, el envejecimiento temprano e incluso una mayor incidencia de tumores (Fernandez-Gonzalez *et al.* 2008).

Consideramos que los factores que están causando la degradación del ADN espermático, en las condiciones experimentales aquí descritas, pueden ser endonucleasas; llegamos a esta conclusión por la similitud existente entre nuestras observaciones y las de otros autores que describen su presencia. En primer lugar, varios autores han propuesto la activación de nucleasas cuando los espermatozoides son sometidos a determinadas condiciones (Lagarkova *et al.* 1995; Maione *et al.* 1997; Sakkas *et al.* 2002; Tateno *et al.* 2000); más recientemente, se ha demostrado la existencia de nucleasas endógenas en los espermatozoides maduros de ratón, hámster y seres humanos (Sotolongo *et al.* 2005); además, estas nucleasas son activadas tras la congelación-descongelación de espermatozoides en un medio sin crioprotectores (Sotolongo *et al.* 2005). Al igual que las endonucleasas descritas en las células somáticas (Lagarkova *et al.* 1995), las nucleasas de los espermatozoides también necesitan la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  para poder actuar (Sotolongo *et al.* 2005). Varios autores han observado que estas nucleasas pueden ser inhibidas por la presencia de agentes quelantes como EDTA y EGTA (Kusakabe *et al.* 2001; Szczygiel *et al.* 2003; Szczygiel and Ward, 2002; Ward and Ward, 2004). Otros autores han descrito que en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  en el medio de cultivo, se mejora la estabilidad cromosómica espermática (Kuretake *et al.* 1996; Tateno *et al.* 2000). Estas observaciones apoyan el hecho de que en este trabajo no se haya observado un aumento en la fragmentación del ADN espermático cuando los espermatozoides son incubados en medio condicionado (MC) suplementado con EDTA.

Aunque los resultados y las publicaciones mencionadas hacen pensar que las encargadas de provocar la fragmentación del ADN espermático pueden ser endonucleasas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ , no se puede excluir la posibilidad de que existan otros factores que actúen conjuntamente con las endonucleasas. Se ha descrito recientemente que la Topoisomerasa IIB junto con una nucleasa extracelular interaccionan para digerir el ADN espermático de una forma similar a la apoptosis (Shaman *et al.* 2006); otro de los factores implicados puede ser el aumento de los radicales libres de oxígeno (RLO) provocado por enzimas liberadas por los espermatozoides con membrana dañada presentes en el MC (Aitken and Baker, 2004); además,

puede haber diferentes tipos de nucleasas u otros factores implicados en la degradación del ADN que no sean dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  ya que algunos autores han observado que la degradación del ADN espermático, en espermatozoides recogidos del eyaculado, se sigue produciendo en medios que contienen EDTA (Yamauchi *et al.* 2007).

Tanto en el segundo capítulo como en el tercer capítulo experimental pretendíamos mediante unas condiciones experimentales determinadas observar si existía un aumento de la fragmentación del ADN espermático y evaluar las consecuencias reproductivas de la utilización de dichos espermatozoides. Ahora bien, se debe considerar, en primer lugar, que los mecanismos por los cuales se produce la fragmentación del ADN espermático son diferentes en ambos experimentos. En el experimento del estrés térmico escrotal, según lo aportado anteriormente, el aumento de la fragmentación en el ADN espermático en los espermatozoides presentes en el epidídimo en el momento del tratamiento puede deberse a un aumento del estrés oxidativo. El estrés oxidativo ha sido propuesto por numerosos autores como causa de fragmentación del ADN espermático (Aitken and Baker, 2004). Sin embargo, el aumento de la fragmentación del ADN espermático observado en los demás momentos tras el estrés térmico (7 a 28 días después) puede deberse a que el estrés térmico ha podido provocar daños en el ADN de las células germinales que no han podido ser reparados durante la espermatogénesis o bien a que, como consecuencias del estrés térmico, se ha alterado la fisiología del testículo, reducido la expresión de numerosos genes implicados en la reparación del ADN así como la recombinación (Rockett *et al.* 2001) siendo imposible llevar a cabo el proceso normal de espermatogénesis; también pudo ser debido a una combinación de los mecanismos descritos. Es en el tercer capítulo experimental donde, probablemente, son los factores liberados por los espermatozoides con la membrana dañada, los que intervienen en la degradación del ADN espermático, aunque no podemos descartar que el estrés oxidativo inducido en estas condiciones experimentales juegue un papel importante en el aumento en el porcentaje de espermatozoides con ADN fragmentado.

Si comparamos en los dos experimentos las consecuencias reproductivas de la utilización de muestras espermáticas que presentan un aumento en el porcentaje de espermatozoides con ADN fragmentado, se debe tener en cuenta el método de reproducción utilizado en cada caso. Así pues, en el segundo capítulo experimental, la utilización de un sistema de monta natural hace que las posibles alteraciones en membrana y mitocondrias de los espermatozoides como consecuencia de estrés oxidativo dificulten la capacidad fecundante de los espermatozoides; con lo que los espermatozoides que presenten daño en el ADN espermático y que a su vez tengan alterados los parámetros de viabilidad y/o motilidad no llegarán a fecundar el ovocito (Twigg *et al.* 1998). Sin embargo, en el tercer capítulo experimental, donde los espermatozoides no tienen que sobrepasar las barreras fisiológicas de selección para fecundar los ovocitos, sino que son inyectados directamente en el ovocito mediante la técnica de ICSI, sí que observamos como consecuencia del daño nuclear espermático un descenso en la tasa de implantación embrionaria, que nos indica que la calidad embrionaria se ha visto comprometida. En este caso, existe una



correlación negativa evidente entre el incremento en el porcentaje de espermatozoides con ADN fragmentado y la calidad embrionaria. El hecho de que las consecuencias sobre el desarrollo embrionario sean diferentes en ambos experimentos no puede ser sólo atribuido al método de reproducción empleado, ya que hay que tener en cuenta que el origen de la fragmentación del ADN espermático es diferente en ambos casos y que la habilidad del embrión para reparar las alteraciones del ADN puede también ser diferente.

Conocer qué factores están involucrados en la fragmentación del ADN espermático e identificar qué condiciones favorecen un aumento de esa fragmentación es de vital importancia para diseñar los protocolos óptimos de manipulación y conservación de espermatozoides que permitan mantener la integridad de su ADN. La integridad del ADN espermático es requisito indispensable para el éxito reproductivo y requiere ser evaluada especialmente con la utilización de técnicas de reproducción asistida como ICSI. El conjunto de experimentos realizados en esta tesis doctoral ponen de manifiesto la influencia negativa de factores físicos como el estrés térmico en la fisiología reproductiva de los animales y la necesidad de realizar una correcta manipulación de las muestras seminales antes de su utilización en los procedimientos de TRA, así como un control estricto de las condiciones de cultivo de los embriones en estadios preimplantacionales. Se ha demostrado, además, que la incorrecta manipulación de las muestras espermáticas y/o de los embriones pueden dar lugar a graves consecuencias como son el descenso en la tasa de implantación embrionaria, el número de fetos e incluso la alteración de la proporción de sexos de la descendencia observándose una distorsión de la proporción de sexos a favor de las hembras.

## **CONCLUSIONES**



1. La mayor supervivencia de embriones de sexo femenino en situaciones de estrés térmico produce una distorsión de la proporción de sexos a favor de las hembras y se relaciona con la expresión diferencial de un gen ligado al cromosoma X, *G6pdx*, en el estadio de blastocisto.
2. La expresión de *G6pdx* condiciona, en embriones de distinto sexo, la concentración relativa de peróxido de hidrógeno y la expresión diferencial de ciertos genes autosómicos.
3. El estrés térmico escrotal transitorio afecta de forma diferencial a los distintos tipos de células germinales masculinas presentes en el testículo, dando lugar a espermatozoides con diferentes grados de alteración en viabilidad, motilidad e integridad del ADN espermático.
4. Las células germinales en desarrollo son más susceptibles al estrés térmico escrotal que los espermatozoides.
5. El estrés térmico escrotal afecta de forma particular a los espermatozoides maduros, produciendo una distorsión de la proporción de sexos a favor de las hembras en la descendencia de los animales tratados y apareados el mismo día en que son sometidos al estrés.
6. Algunos factores del citoplasma espermático, que se liberan como consecuencia del daño de la membrana espermática, actúan en presencia de iones  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  induciendo la fragmentación del ADN de los espermatozoides, lo cual puede comprometer la fertilidad al utilizar técnicas de reproducción asistida.
7. El daño nuclear espermático inducido por estos factores, compromete la tasa de implantación embrionaria y el desarrollo fetal de los embriones producidos mediante ICSI.
8. El cultivo *in vitro* disminuye preferentemente la implantación de los embriones producidos mediante fecundación por ICSI cuando se utilizan espermatozoides con daño nuclear.



## **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**



- Acharyya, S., S. Kanjilal, and A.K. Bhattacharyya. 2005. Does human sperm nuclear DNA integrity affect embryo quality? *Indian J Exp Biol.* 43:1016-22.
- Agarwal, A., and S.S. Allamaneni. 2004. The effect of sperm DNA damage on assisted reproduction outcomes. A review. *Minerva Ginecol.* 56:235-45.
- Agarwal, A., and T.M. Said. 2003. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Hum Reprod Update.* 9:331-45.
- Ahmadi, A., and S.C. Ng. 1999a. Developmental capacity of damaged spermatozoa. *Hum Reprod.* 14:2279-85.
- Ahmadi, A., and S.C. Ng. 1999b. Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa. *J Exp Zool.* 284:696-704.
- Aitken, R.J. 1999. The Amoroso Lecture. The human spermatozoon--a cell in crisis? *J Reprod Fertil.* 115:1-7.
- Aitken, R.J., and M.A. Baker. 2004. Oxidative stress and male reproductive biology. *Reprod Fertil Dev.* 16:581-8.
- Aitken, R.J., and M.A. Baker. 2006. Oxidative stress, sperm survival and fertility control. *Mol Cell Endocrinol.* 250:66-9.
- Aitken, R.J., M.A. Baker, and D. Sawyer. 2003. Oxidative stress in the male germ line and its role in the aetiology of male infertility and genetic disease. *Reprod Biomed Online.* 7:65-70.
- Aitken, R.J., and G.N. De Iuliis. 2007. Origins and consequences of DNA damage in male germ cells. *Reprod Biomed Online.* 14:727-33.
- Aitken, R.J., E. Gordon, D. Harkiss, J.P. Twigg, P. Milne, Z. Jennings, and D.S. Irvine. 1998. Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biol Reprod.* 59:1037-46.
- Aitken, R.J., and C. Krausz. 2001. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction.* 122:497-506.
- Al-Katanani, Y.M., D.W. Webb, and P.J. Hansen. 1999. Factors affecting seasonal variation in 90-day nonreturn rate to first service in lactating Holstein cows in a hot climate. *J Dairy Sci.* 82:2611-6.
- Arechiga, C.F., A.D. Ealy, and P.J. Hansen. 1995. Evidence that glutathione is involved in thermotolerance of preimplantation murine embryos. *Biol Reprod.* 52:1296-301.
- Arechiga, C.F., and P.J. Hansen. 1998. Response of preimplantation murine embryos to heat shock as modified by developmental stage and glutathione status. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 34:655-9.
- Arny, M., L. Nachtigall, and J. Quagliarello. 1987. The effect of preimplantation culture conditions on murine embryo implantation and fetal development. *Fertil Steril.* 48:861-5.
- Avery, B., C.B. Jorgensen, V. Madison, and T. Greve. 1992. Morphological development and sex of bovine in vitro-fertilized embryos. *Mol Reprod Dev.* 32:265-70.
- Baker, M.A., and R.J. Aitken. 2005. Reactive oxygen species in spermatozoa: methods for monitoring and significance for the origins of genetic disease and infertility. *Reprod Biol Endocrinol.* 3:67.



- Ballachey, B.E., D.P. Evenson, and R.G. Saacke. 1988. The sperm chromatin structure assay. Relationship with alternate tests of semen quality and heterospermic performance of bulls. *J Androl.* 9:109-15.
- Banks, S., S.A. King, D.S. Irvine, and P.T. Saunders. 2005. Impact of a mild scrotal heat stress on DNA integrity in murine spermatozoa. *Reproduction.* 129:505-14.
- Barroso, G., M. Morshedi, and S. Oehninger. 2000. Analysis of DNA fragmentation, plasma membrane translocation of phosphatidylserine and oxidative stress in human spermatozoa. *Hum Reprod.* 15:1338-44.
- Bedford, J.M. 1991. Effects of elevated temperature on the epididymis and testis: experimental studies. *Adv Exp Med Biol.* 286:19-32.
- Benchabib, M., V. Braun, J. Lornage, S. Hadj, B. Salle, H. Lejeune, and J.F. Guerin. 2003. Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique. *Hum Reprod.* 18:1023-8.
- Bermejo-Alvarez, P., D. Rizados, D. Rath, P. Lonergan, and A. Gutierrez-Adan. 2008. Epigenetic differences between male and female bovine blastocysts produced in vitro. *Physiol Genomics.* 32:264-72.
- Bernardi, M.L., and C. Delouis. 1996. Sex-related differences in the developmental rate of in-vitro matured/in-vitro fertilized ovine embryos. *Hum Reprod.* 11:621-6.
- Boe-Hansen, G.B., P. Christensen, D. Vibjerg, M.B. Nielsen, and A.M. Hedeboe. 2008. Sperm chromatin structure integrity in liquid stored boar semen and its relationships with field fertility. *Theriogenology.* 69:728-36.
- Boe-Hansen, G.B., A.K. Ersboll, T. Greve, and P. Christensen. 2005. Increasing storage time of extended boar semen reduces sperm DNA integrity. *Theriogenology.* 63:2006-19.
- Boe-Hansen, G.B., J. Fedder, A.K. Ersboll, and P. Christensen. 2006. The sperm chromatin structure assay as a diagnostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod.* 21:1576-82.
- Borini, A., N. Tarozzi, D. Bizzaro, M.A. Bonu, L. Fava, C. Flamigni, and G. Coticchio. 2006. Sperm DNA fragmentation: paternal effect on early post-implantation embryo development in ART. *Hum Reprod.* 21:2876-81.
- Braun, R.E. 1998. Post-transcriptional control of gene expression during spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol.* 9:483-9.
- Bungum, M., P. Humaidan, M. Spano, K. Jepson, L. Bungum, and A. Giwercman. 2004. The predictive value of sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters for the outcome of intrauterine insemination, IVF and ICSI. *Hum Reprod.* 19:1401-8.
- Burgoyne, P.S., A.R. Thornhill, S.K. Boudrean, S.M. Darling, C.E. Bishop, and E.P. Evans. 1995. The genetic basis of XX-XY differences present before gonadal sex differentiation in the mouse. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 350:253-60 discussion 260-1.
- Cameron, E.Z., P.R. Lemons, P.W. Bateman, and N.C. Bennett. 2008. Experimental alteration of litter sex ratios in a mammal. *Proc Biol Sci.* 275:323-7.
- Cammack, K.M., H. Mesa, and W.R. Lamberson. 2006. Genetic variation in fertility of heat-stressed male mice. *Theriogenology.* 66:2195-201.
- Carrel, L., and H.F. Willard. 1999. Heterogeneous gene expression from the inactive X chromosome: an X-linked gene that escapes X inactivation in some human cell lines but is inactivated in others. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:7364-9.

- Carrel, L., and H.F. Willard. 2005. X-inactivation profile reveals extensive variability in X-linked gene expression in females. *Nature*. 434:400-4.
- Carrell, D.T., L. Liu, C.M. Peterson, K.P. Jones, H.H. Hatasaka, L. Erickson, and B. Campbell. 2003a. Sperm DNA fragmentation is increased in couples with unexplained recurrent pregnancy loss. *Arch Androl*. 49:49-55.
- Carrell, D.T., A.L. Wilcox, L. Lowy, C.M. Peterson, K.P. Jones, L. Erickson, B. Campbell, D.W. Branch, and H.H. Hatasaka. 2003b. Elevated sperm chromosome aneuploidy and apoptosis in patients with unexplained recurrent pregnancy loss. *Obstet Gynecol*. 101:1229-35.
- Cassar, G., W.A. King, and G.J. King. 1994. Influence of sex on early growth of pig conceptuses. *J Reprod Fertil*. 101:317-20.
- Cebesoy, F.B., K. Aydos, and C. Unlu. 2006. Effect of sperm chromatin damage on fertilization ratio and embryo quality post-ICSI. *Arch Androl*. 52:397-402.
- Clermont, Y. 1972. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol Rev*. 52:198-236.
- Chapman, V.M., and T.B. Shows. 1976. Somatic cell genetic evidence for X-chromosome linkage of three enzymes in the mouse. *Nature*. 259:665-7.
- De Vita, R., A. Calugi, C. Chiarantano, D. Forte, F. Mauro, and R. Uccelli. 1990. Effects of heat on mouse spermatogenesis monitored by flow cytometry. *Int J Hyperthermia*. 6:543-51.
- Downs, S.M., P.G. Humpherson, and H.J. Leese. 1998. Meiotic induction in cumulus cell-enclosed mouse oocytes: involvement of the pentose phosphate pathway. *Biol Reprod*. 58:1084-94.
- Duran, E.H., M. Morshedi, S. Taylor, and S. Oehninger. 2002. Sperm DNA quality predicts intrauterine insemination outcome: a prospective cohort study. *Hum Reprod*. 17:3122-8.
- Eaker, S., J. Cobb, A. Pyle, and M.A. Handel. 2002. Meiotic prophase abnormalities and metaphase cell death in MLH1-deficient mouse spermatocytes: insights into regulation of spermatogenic progress. *Dev Biol*. 249:85-95.
- Ealy, A.D., and P.J. Hansen. 1994. Induced thermotolerance during early development of murine and bovine embryos. *J Cell Physiol*. 160:463-8.
- Edwards, J.L., W.A. King, S.J. Kawarsky, and A.D. Ealy. 2001. Responsiveness of early embryos to environmental insults: potential protective roles of HSP70 and glutathione. *Theriogenology*. 55:209-23.
- Enciso, M., L. Muriel, J.L. Fernandez, V. Goyanes, E. Segrelles, M. Marcos, J.M. Montejo, M. Ardoy, A. Pacheco, and J. Gosálvez. 2006. Infertile men with varicocele show a high relative proportion of sperm cells with intense nuclear damage level, evidenced by the sperm chromatin dispersion test. *J Androl*. 27:106-11.
- Erickson, R.P. 1997. Does sex determination start at conception? *Bioessays*. 19:1027-32.
- Evenson, D.P. 1999. Loss of livestock breeding efficiency due to uncompensable sperm nuclear defects. *Reprod Fertil Dev*. 11:1-15.
- Evenson, D.P., Z. Darzynkiewicz, and M.R. Melamed. 1980. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science*. 210:1131-3.
- Evenson, D.P., L.K. Jost, D. Marshall, M.J. Zinaman, E. Clegg, K. Purvis, P. de Angelis, and O.P. Claussen. 1999. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod*. 14:1039-49.

- Evenson, D.P., K.L. Larson, and L.K. Jost. 2002. Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *J Androl.* 23:25-43.
- Fatehi, A.N., M.M. Bevers, E. Schoevers, B.A. Roelen, B. Colenbrander, and B.M. Gadella. 2006. DNA damage in bovine sperm does not block fertilization and early embryonic development but induces apoptosis after the first cleavages. *J Androl.* 27:176-88.
- Favor, J. 1999. Mechanisms of mutation induction in germ cells of the mouse as assessed by the specific locus test. *Mutat Res.* 428:227-36.
- Fernandez-Gonzalez, R., P. Moreira, A. Bilbao, A. Jimenez, M. Perez-Crespo, M.A. Ramirez, F. Rodriguez De Fonseca, B. Pintado, and A. Gutierrez-Adan. 2004. Long-term effect of in vitro culture of mouse embryos with serum on mRNA expression of imprinting genes, development, and behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:5880-5.
- Fernandez-Gonzalez, R., P.N. Moreira, M. Perez-Crespo, M. Sanchez-Martin, M.A. Ramirez, E. Pericuesta, A. Bilbao, P. Bermejo-Alvarez, J. de Dios Hourcade, F.R. de Fonseca, and A. Gutierrez-Adan. 2008. Long-term effects of mouse intracytoplasmic sperm injection with DNA-fragmented sperm on health and behavior of adult offspring. *Biol Reprod.* 78:761-72.
- Fernandez-Gonzalez R, M.P., Bilbao A, Ramirez MA, Perez-Crespo M, Pintado B, Rodriguez de Fonseca, F and Gutierrez-Adan A. 2005. Long term health and behavior of ICSI produced mice. *Reprod Fert Dev* 17:151.
- Fernandez-Gonzalez, R., M.A. Ramirez, A. Bilbao, F.R. De Fonseca, and A. Gutierrez-Adan. 2007. Suboptimal in vitro culture conditions: an epigenetic origin of long-term health effects. *Mol Reprod Dev.* 74:1149-56.
- Fernandez, J.L., and J. Gosalvez. 2002. Application of FISH to detect DNA damage. DNA breakage detection-FISH (DBD-FISH). *Methods Mol Biol.* 203:203-16.
- Fernandez, J.L., L. Muriel, V. Goyanes, E. Segrelles, J. Gosalvez, M. Enciso, M. LaFromboise, and C. De Jonge. 2005a. Halosperm is an easy, available, and cost-effective alternative for determining sperm DNA fragmentation. *Fertil Steril.* 84:860.
- Fernandez, J.L., L. Muriel, V. Goyanes, E. Segrelles, J. Gosalvez, M. Enciso, M. LaFromboise, and C. De Jonge. 2005b. Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. *Fertil Steril.* 84:833-42.
- Fernandez, J.L., L. Muriel, M.T. Rivero, V. Goyanes, R. Vazquez, and J.G. Alvarez. 2003. The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *J Androl.* 24:59-66.
- Fernandez, J.L., F. Vazquez-Gundin, A. Delgado, V.J. Goyanes, J. Ramiro-Diaz, J. de la Torre, and J. Gosalvez. 2000. DNA breakage detection-FISH (DBD-FISH) in human spermatozoa: technical variants evidence different structural features. *Mutat Res.* 453:77-82.
- Filosa, S., A. Fico, F. Paglialunga, M. Balestrieri, A. Crooke, P. Verde, P. Abrescia, J.M. Bautista, and G. Martini. 2003. Failure to increase glucose consumption through the pentose-phosphate pathway results in the death of glucose-6-phosphate dehydrogenase gene-deleted mouse embryonic stem cells subjected to oxidative stress. *Biochem J.* 370:935-43.
- Fischer, M.A., J. Willis, and A. Zini. 2003. Human sperm DNA integrity: correlation with sperm cytoplasmic droplets. *Urology.* 61:207-11.
- Fleming, T.P., W.Y. Kwong, R. Porter, E. Ursell, I. Fesenko, A. Wilkins, D.J. Miller, A.J. Watkins, and J.J. Eckert. 2004. The embryo and its future. *Biol Reprod.* 71:1046-54.

- Franks, S., M.I. McCarthy, and K. Hardy. 2006. Development of polycystic ovary syndrome: involvement of genetic and environmental factors. *Int J Androl.* 29:278-85; discussion 286-90.
- Fraser, L. 2004. Structural damage to nuclear DNA in mammalian spermatozoa: its evaluation techniques and relationship with male infertility. *Pol J Vet Sci.* 7:311-21.
- Fraser, L., and J. Strzezek. 2005. Effects of freezing-thawing on DNA integrity of boar spermatozoa assessed by the neutral comet assay. *Reprod Domest Anim.* 40:530-6.
- Fraser, L., and J. Strzezek. 2006. Effect of different procedures of ejaculate collection, extenders and packages on DNA integrity of boar spermatozoa following freezing-thawing. *Anim Reprod Sci.*
- Fuentes-Mascorro, G., M. Vergara-Onofre, E. Mercado, O. Hernandez-Perez, and A. Rosado. 2000. Participation of DNA structure on sperm chromatin organization. *Arch Androl.* 45:61-71.
- Garcia-Macias, V., P. de Paz, F. Martinez-Pastor, M. Alvarez, S. Gomes-Alves, J. Bernardo, E. Anel, and L. Anel. 2007. DNA fragmentation assessment by flow cytometry and Sperm-Bos-Halomax (bright-field microscopy and fluorescence microscopy) in bull sperm. *Int J Androl.* 30:88-98.
- Genesca, A., M.R. Caballin, R. Miro, J. Benet, J.R. Germa, and J. Egozcue. 1992. Repair of human sperm chromosome aberrations in the hamster egg. *Hum Genet.* 89:181-6.
- Gomendio, M., A.F. Malo, A.J. Soler, M.R. Fernandez-Santos, M.C. Estes, A.J. Garcia, E.R. Roldan, and J. Garde. 2006. Male fertility and sex ratio at birth in red deer. *Science.* 314:1445-7.
- Gopalkrishnan, K., K. Hurkadli, V. Padwal, and D. Balaiah. 1999. Use of acridine orange to evaluate chromatin integrity of human spermatozoa in different groups of infertile men. *Andrologia.* 31:277-82.
- Gorczyca, W., J. Gong, and Z. Darzynkiewicz. 1993. Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays. *Cancer Res.* 53:1945-51.
- Gordon, G., M.C. Mackow, and H.R. Levy. 1995. On the mechanism of interaction of steroids with human glucose 6-phosphate dehydrogenase. *Arch Biochem Biophys.* 318:25-9.
- Grant, V.J., and R.J. Irwin. 2005. Follicular fluid steroid levels and subsequent sex of bovine embryos. *J Exp Zool A Comp Exp Biol.* 303:1120-5.
- Grant, V.J., R.J. Irwin, N.T. Standley, A.N. Shelling, and L.W. Chamley. 2008. Sex of Bovine Embryos May Be Related to Mothers' Preovulatory Follicular Testosterone. *Biol Reprod.*
- Guerin, P., S. El Moutassim, and Y. Menezo. 2001. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Hum Reprod Update.* 7:175-89.
- Gutierrez-Adan, A. 2005. The epigenetic environment: secondary sex ratio depends on differential survival in embryogenesis: comment 1. *Hum Reprod.* 20:2662-3; author reply 2664-5.
- Gutierrez-Adan, A., E. Behboodi, G.B. Andersen, J.F. Medrano, and J.D. Murray. 1996. Relationship between stage of development and sex of bovine IVM-IVF embryos cultured in vitro versus in the sheep oviduct. *Theriogenology.* 46:515-25.
- Gutierrez-Adan, A., E. Behboodi, J.D. Murray, and G.B. Anderson. 1997. Early transcription of the SRY gene by bovine preimplantation embryos. *Mol Reprod Dev.* 48:246-50.

- Gutierrez-Adan, A., J. Granados, B. Pintado, and J. De La Fuente. 2001a. Influence of glucose on the sex ratio of bovine IVM/IVF embryos cultured in vitro. *Reprod Fertil Dev.* 13:361-5.
- Gutierrez-Adan, A., P. Lonergan, D. Rizos, F.A. Ward, M.P. Boland, B. Pintado, and J. de la Fuente. 2001b. Effect of the in vitro culture system on the kinetics of blastocyst development and sex ratio of bovine embryos. *Theriogenology.* 55:1117-26.
- Gutierrez-Adan, A., M. Oter, B. Martinez-Madrid, B. Pintado, and J. De La Fuente. 2000. Differential expression of two genes located on the X chromosome between male and female in vitro-produced bovine embryos at the blastocyst stage. *Mol Reprod Dev.* 55:146-51.
- Gutierrez-Adan, A., M. Perez-Crespo, R. Fernandez-Gonzalez, M. Ramirez, P. Moreira, B. Pintado, P. Lonergan, and D. Rizos. 2006a. Developmental Consequences of Sexual Dimorphism During Pre-implantation Embryonic Development. *Reprod Domest Anim.* 41 Suppl 2:54-62.
- Gutierrez-Adan, A., M. Perez-Crespo, R. Fernandez-Gonzalez, M.A. Ramirez, P. Moreira, B. Pintado, P. Lonergan, and D. Rizos. 2006b. Developmental consequences of sexual dimorphism during pre-implantation embryonic development. *Reprod Domest Anim.* 41 Suppl 2:54-62.
- Gutierrez-Adan, A., G. Perez, J. Granados, J.J. Garde, M. Perez-Guzman, B. Pintado, and J. De La Fuente. 1999. Relationship between sex ratio and time of insemination according to both time of ovulation and maturational state of oocyte. *Zygote.* 7:37-43.
- Haines, G., B. Marples, P. Daniel, and I. Morris. 1998. DNA damage in human and mouse spermatozoa after in vitro-irradiation assessed by the comet assay. *Adv Exp Med Biol.* 444:79-91; discussion 92-3.
- Hammadeh, M.E., M. Radwan, S. Al-Hasani, R. Micu, P. Rosenbaum, M. Lorenz, and W. Schmidt. 2006. Comparison of reactive oxygen species concentration in seminal plasma and semen parameters in partners of pregnant and non-pregnant patients after IVF/ICSI. *Reprod Biomed Online.* 13:696-706.
- Hansen, D., H. Moller, and J. Olsen. 1999. Severe periconceptional life events and the sex ratio in offspring: follow up study based on five national registers. *Bmj.* 319:548-9.
- Harrouk, W., A. Codrington, R. Vinson, B. Robaire, and B.F. Hales. 2000. Paternal exposure to cyclophosphamide induces DNA damage and alters the expression of DNA repair genes in the rat preimplantation embryo. *Mutat Res.* 461:229-41.
- Harvey, A.J., K.L. Kind, and J.G. Thompson. 2002. REDOX regulation of early embryo development. *Reproduction.* 123:479-86.
- Henkel, R., M. Hajimohammad, T. Stalf, C. Hoogendijk, C. Mehnert, R. Menkveld, H. Gips, W.B. Schill, and T.F. Kruger. 2004. Influence of deoxyribonucleic acid damage on fertilization and pregnancy. *Fertil Steril.* 81:965-72.
- Hernandez, M., J. Roca, J. Ballester, J.M. Vazquez, E.A. Martinez, A. Johannisson, F. Saravia, and H. Rodriguez-Martinez. 2006. Differences in SCSA outcome among boars with different sperm freezability. *Int J Androl.* 29:583-91.
- Hess, R.D.F., LR. 2007. Spermatogenesis and Cycle of the Seminiferous Epithelium. *Molecular Mechanisms in Spermatogenesis.* Capitulo 2.
- Hogan, B., F. Constantini, E. Lacy. 1986. *Manipulating the Mouse Embryo. A Laboratory Manual.* Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

- Host, E., S. Lindenberg, and S. Smidt-Jensen. 2000. The role of DNA strand breaks in human spermatozoa used for IVF and ICSI. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 79:559-63.
- Huang, C.C., D.P. Lin, H.M. Tsao, T.C. Cheng, C.H. Liu, and M.S. Lee. 2005. Sperm DNA fragmentation negatively correlates with velocity and fertilization rates but might not affect pregnancy rates. *Fertil Steril.* 84:130-40.
- Hud, N.V., M.J. Allen, K.H. Downing, J. Lee, and R. Balhorn. 1993. Identification of the elemental packing unit of DNA in mammalian sperm cells by atomic force microscopy. *Biochem Biophys Res Commun.* 193:1347-54.
- Hud, N.V., F.P. Milanovich, and R. Balhorn. 1994. Evidence of novel secondary structure in DNA-bound protamine is revealed by Raman spectroscopy. *Biochemistry.* 33:7528-35.
- Ikeda, M., H. Kodama, J. Fukuda, Y. Shimizu, M. Murata, J. Kumagai, and T. Tanaka. 1999. Role of radical oxygen species in rat testicular germ cell apoptosis induced by heat stress. *Biol Reprod.* 61:393-9.
- Ingraham RH, G.D., Wager WD. 1971. Relationship of temperature and humidity to conception rate of Holstein cows in subtropical climate. *J Dairy Sci.* 57:476-481.
- Irvine, D.S., J.P. Twigg, E.L. Gordon, N. Fulton, P.A. Milne, and R.J. Aitken. 2000. DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. *J Androl.* 21:33-44.
- Ivell, R. 2007. Lifestyle impact and the biology of the human scrotum. *Reprod Biol Endocrinol.* 5:15.
- Iwata, H. 2002. Role of G6PD activity on Sex Ratio and Developmental Competence of Bovine Embryos under Oxidative Stress. *J.Reprod.Dev* 48:447-453.
- James, W.H. 1986. Hormonal control of sex ratio. *J Theor Biol.* 118:427-41.
- James, W.H. 1987. Hormone levels of parents and sex ratios of offspring. *J Theor Biol.* 129:139-40.
- James, W.H. 1989. Parental hormone levels and mammalian sex ratios at birth. *J Theor Biol.* 139:59-67.
- James, W.H. 1992. The hypothesized hormonal control of mammalian sex ratio at birth--a second update. *J Theor Biol.* 155:121-8.
- James, W.H. 1996. Male reproductive hazards and occupation. *Lancet.* 347:773.
- James, W.H. 1997a. Offspring sex ratio as a potential monitor of reproductive disorders in communities near hazardous chemical sites. *Reprod Toxicol.* 11:893-5.
- James, W.H. 1997b. A potential mechanism for sex ratio variation in mammals. *J Theor Biol.* 189:253-5.
- James, W.H. 1998a. Hypotheses on mammalian sex ratio variation at birth. *J Theor Biol.* 192:113-6.
- James, W.H. 1998b. Sex ratio of offspring of diabetics. *Lancet.* 351:1514.
- James, W.H. 1998c. The sex ratio of offspring of people exposed to boron. *Reprod Toxicol.* 12:673-4.
- James, W.H. 1998d. Was the widespread decline in sex ratios at birth caused by reproductive hazards? *Hum Reprod.* 13:1083-4.
- James, W.H. 2004. Do gonadal hormones confound between parental smoking and offspring sex ratio? *Int J Epidemiol.* 33:226.

- James, W.H. 2007. Testosterone and male fertility in red deer. *Science*. 316:980-1; author reply 980-1.
- Jannes, P., C. Spiessens, I. Van der Auwera, T. D'Hooghe, G. Verhoeven, and D. Vanderschueren. 1998. Male subfertility induced by acute scrotal heating affects embryo quality in normal female mice. *Hum Reprod*. 13:372-5.
- Jara, M., P. Esponda, and R. Carballada. 2002. Abdominal temperature induces region-specific p53-independent apoptosis in the cauda epididymidis of the mouse. *Biol Reprod*. 67:1189-96.
- Jaroudi, S., and S. SenGupta. 2007. DNA repair in mammalian embryos. *Mutat Res*. 635:53-77.
- Ji, B.T., X.O. Shu, M.S. Linet, W. Zheng, S. Wacholder, Y.T. Gao, D.M. Ying, and F. Jin. 1997. Paternal cigarette smoking and the risk of childhood cancer among offspring of nonsmoking mothers. *J Natl Cancer Inst*. 89:238-44.
- Jimenez, A., R. Fernandez, N. Madrid-Bury, P.N. Moreira, C. Borque, B. Pintado, and A. Gutierrez-Adan. 2003a. Experimental demonstration that pre- and post-conceptual mechanisms influence sex ratio in mouse embryos. *Mol Reprod Dev*. 66:162-5.
- Jimenez, A., N. Madrid-Bury, R. Fernandez, S. Perez-Garnelo, P. Moreira, B. Pintado, J. de la Fuente, and A. Gutierrez-Adan. 2003b. Hyperglycemia-induced apoptosis affects sex ratio of bovine and murine preimplantation embryos. *Mol Reprod Dev*. 65:180-7.
- Jousan, F.D., and P.J. Hansen. 2004. Insulin-like growth factor-I as a survival factor for the bovine preimplantation embryo exposed to heat shock. *Biol Reprod*. 71:1665-70.
- Kasimanickam, R., V. Kasimanickam, C.D. Thatcher, R.L. Nebel, and B.G. Cassell. 2006. Relationships among lipid peroxidation, glutathione peroxidase, superoxide dismutase, sperm parameters, and competitive index in dairy bulls. *Theriogenology*. 67:4:1004-1012.
- Kasimanickam, R., R.L. Nebel, I.D. Peeler, W.L. Silvia, K.T. Wolf, A.J. McAllister, and B.G. Cassell. 2006b. Breed differences in competitive indices of Holstein and Jersey bulls and their association with sperm DNA fragmentation index and plasma membrane integrity. *Theriogenology*. 66:1307-15.
- Khosla, S., W. Dean, D. Brown, W. Reik, and R. Feil. 2001a. Culture of preimplantation mouse embryos affects fetal development and the expression of imprinted genes. *Biol Reprod*. 64:918-26.
- Khosla, S., W. Dean, W. Reik, and R. Feil. 2001b. Culture of preimplantation embryos and its long-term effects on gene expression and phenotype. *Hum Reprod Update*. 7:419-27.
- Kimura, K., L.D. Spate, M.P. Green, C.N. Murphy, G.E. Seidel, Jr., and R.M. Roberts. 2004. Sexual dimorphism in interferon-tau production by in vivo-derived bovine embryos. *Mol Reprod Dev*. 67:193-9.
- Kimura, K., L.D. Spate, M.P. Green, and R.M. Roberts. 2005. Effects of D-glucose concentration, D-fructose, and inhibitors of enzymes of the pentose phosphate pathway on the development and sex ratio of bovine blastocysts. *Mol Reprod Dev*. 72:201-7.
- Kobayashi, S., A. Isotani, N. Mise, M. Yamamoto, Y. Fujihara, K. Kaseda, T. Nakanishi, M. Ikawa, H. Hamada, K. Abe, and M. Okabe. 2006. Comparison of gene expression in male and female mouse blastocysts revealed imprinting of the X-linked gene, *Rhox5/Pem*, at preimplantation stages. *Curr Biol*. 16:166-72.
- Kochhar, H.P., J. Peippo, and W.A. King. 2001. Sex related embryo development. *Theriogenology*. 55:3-14.

- Kodama, H., R. Yamaguchi, J. Fukuda, H. Kasai, and T. Tanaka. 1997. Increased oxidative deoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients. *Fertil Steril.* 68:519-24.
- Krackow, S. 1995a. The developmental asynchrony hypothesis for sex ratio manipulation. *J Theor Biol.* 176:273-80.
- Krackow, S. 1995b. Potential mechanisms for sex ratio adjustment in mammals and birds. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 70:225-41.
- Krausz, C., and C. Giachini. 2007. Genetic risk factors in male infertility. *Arch Androl.* 53:125-33.
- Kuretake, S., Y. Kimura, K. Hoshi, and R. Yanagimachi. 1996. Fertilization and development of mouse oocytes injected with isolated sperm heads. *Biol Reprod.* 55:789-95.
- Kusakabe, H., M.A. Szczygiel, D.G. Whittingham, and R. Yanagimachi. 2001. Maintenance of genetic integrity in frozen and freeze-dried mouse spermatozoa. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:13501-6.
- Kwong, W.Y., A.E. Wild, P. Roberts, A.C. Willis, and T.P. Fleming. 2000. Maternal undernutrition during the preimplantation period of rat development causes blastocyst abnormalities and programming of postnatal hypertension. *Development.* 127:4195-202.
- Lagarkova, M.A., O.V. Iarovaia, and S.V. Razin. 1995. Large-scale fragmentation of mammalian DNA in the course of apoptosis proceeds via excision of chromosomal DNA loops and their oligomers. *J Biol Chem.* 270:20239-41.
- LaMunyon, C.W., and S. Ward. 1997. Increased competitiveness of nematode sperm bearing the male X chromosome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:185-9.
- Larson, K.L., C.J. DeJonge, A.M. Barnes, L.K. Jost, and D.P. Evenson. 2000. Sperm chromatin structure assay parameters as predictors of failed pregnancy following assisted reproductive techniques. *Hum Reprod.* 15:1717-22.
- Larson, M.A., K. Kimura, H.M. Kubisch, and R.M. Roberts. 2001. Sexual dimorphism among bovine embryos in their ability to make the transition to expanded blastocyst and in the expression of the signaling molecule IFN-tau. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:9677-82.
- Latham, K.E., and R.M. Schultz. 2001. Embryonic genome activation. *Front Biosci.* 6:D748-59.
- Lewis, S.E., and R.J. Aitken. 2005. DNA damage to spermatozoa has impacts on fertilization and pregnancy. *Cell Tissue Res.* 322:33-41.
- Lopes, S., A. Jurisicova, J.G. Sun, and R.F. Casper. 1998a. Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum Reprod.* 13:896-900.
- Lopes, S., J.G. Sun, A. Jurisicova, J. Meriano, and R.F. Casper. 1998b. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality semen samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril.* 69:528-32.
- Lopez-Fernandez, C., F. Crespo, F. Arroyo, J.L. Fernandez, P. Arana, S.D. Johnston, and J. Gosalvez. 2007. Dynamics of sperm DNA fragmentation in domestic animals II. The stallion. *Theriogenology.* 68:1240-50.
- Love, C.C., and R.M. Kenney. 1999. Scrotal heat stress induces altered sperm chromatin structure associated with a decrease in protamine disulfide bonding in the stallion. *Biol Reprod.* 60:615-20.



- Lue, Y., A.P. Hikim, C. Wang, M. Im, A. Leung, and R.S. Swerdloff. 2000. Testicular heat exposure enhances the suppression of spermatogenesis by testosterone in rats: the "two-hit" approach to male contraceptive development. *Endocrinology*. 141:1414-24.
- Lue, Y.H., A.P. Hikim, R.S. Swerdloff, P. Im, K.S. Taing, T. Bui, A. Leung, and C. Wang. 1999. Single exposure to heat induces stage-specific germ cell apoptosis in rats: role of intratesticular testosterone on stage specificity. *Endocrinology*. 140:1709-17.
- Mahsoudi, B., A. Li, and C. O'Neill. 2007. Assessment of the long-term and transgenerational consequences of perturbing preimplantation embryo development in mice. *Biol Reprod*. 77:889-96.
- Maione, B., C. Pittoggi, L. Achene, R. Lorenzini, and C. Spadafora. 1997. Activation of endogenous nucleases in mature sperm cells upon interaction with exogenous DNA. *DNA Cell Biol*. 16:1087-97.
- Mak, W., T.B. Nesterova, M. de Napoles, R. Appanah, S. Yamanaka, A.P. Otte, and N. Brockdorff. 2004. Reactivation of the paternal X chromosome in early mouse embryos. *Science*. 303:666-9.
- Manicardi, G.C., P.G. Bianchi, S. Pantano, P. Azzoni, D. Bizzaro, U. Bianchi, and D. Sakkas. 1995. Presence of endogenous nicks in DNA of ejaculated human spermatozoa and its relationship to chromomycin A3 accessibility. *Biol Reprod*. 52:864-7.
- Manicardi, G.C., A. Tombacco, D. Bizzaro, U. Bianchi, P.G. Bianchi, and D. Sakkas. 1998. DNA strand breaks in ejaculated human spermatozoa: comparison of susceptibility to the nick translation and terminal transferase assays. *Histochem J*. 30:33-9.
- Marcon, L., and G. Boissonneault. 2004. Transient DNA strand breaks during mouse and human spermiogenesis new insights in stage specificity and link to chromatin remodeling. *Biol Reprod*. 70:910-8.
- Marchetti, F., J. Essers, R. Kanaar, and A.J. Wyrobek. 2007. Disruption of maternal DNA repair increases sperm-derived chromosomal aberrations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104:17725-9.
- Martin, G., O. Sabido, P. Durand, and R. Levy. 2004. Cryopreservation induces an apoptosis-like mechanism in bull sperm. *Biol Reprod*. 71:28-37.
- Matsuda, Y., N. Seki, T. Utsugi-Takeuchi, and I. Tobar. 1989. X-ray- and mitomycin C (MMC)-induced chromosome aberrations in spermiogenic germ cells and the repair capacity of mouse eggs for the X-ray and MMC damage. *Mutat Res*. 211:65-75.
- Matsuzuka, T., M. Ozawa, A. Nakamura, A. Ushitani, M. Hirabayashi, and Y. Kanai. 2005. Effects of heat stress on the redox status in the oviduct and early embryonic development in mice. *J Reprod Dev*. 51:281-7.
- McCarthy, S., and W.S. Ward. 2000. Interaction of exogenous DNA with the nuclear matrix of live spermatozoa. *Mol Reprod Dev*. 56:235-7.
- McEvoy, T.G., C.J. Ashworth, J.A. Rooke, and K.D. Sinclair. 2003. Consequences of manipulating gametes and embryos of ruminant species. *Reprod Suppl*. 61:167-82.
- McLay, D.W., and H.J. Clarke. 2003. Remodelling the paternal chromatin at fertilization in mammals. *Reproduction*. 125:625-33.
- McPherson, S., and F.J. Longo. 1993a. Chromatin structure-function alterations during mammalian spermatogenesis: DNA nicking and repair in elongating spermatids. *Eur J Histochem*. 37:109-28.

- McPherson, S.M., and F.J. Longo. 1992. Localization of DNase I-hypersensitive regions during rat spermatogenesis: stage-dependent patterns and unique sensitivity of elongating spermatids. *Mol Reprod Dev.* 31:268-79.
- McPherson, S.M., and F.J. Longo. 1993b. Nicking of rat spermatid and spermatozoa DNA: possible involvement of DNA topoisomerase II. *Dev Biol.* 158:122-30.
- Menezes, Y.J. 2006. Paternal and maternal factors in preimplantation embryogenesis: interaction with the biochemical environment. *Reprod Biomed Online.* 12:616-21.
- Mieusset, R., B. Bengoudifa, and L. Bujan. 2007. Effect of posture and clothing on scrotal temperature in fertile men. *J Androl.* 28:170-5.
- Mieusset, R., L. Bujan, A. Mansat, and F. Pontonnier. 1992a. [Scrotal hyperthermia and male infertility]. *Prog Urol.* 2:31-5; discussion 35-6.
- Mieusset, R., L. Bujan, C. Mondinat, A. Mansat, F. Pontonnier, and H. Grandjean. 1987. Association of scrotal hyperthermia with impaired spermatogenesis in infertile men. *Fertil Steril.* 48:1006-11.
- Mieusset, R., P. Quintana Casares, L.G. Sanchez Partida, S.F. Sowerbutts, J.L. Zupp, and B.P. Setchell. 1992b. Effects of heating the testes and epididymides of rams by scrotal insulation on fertility and embryonic mortality in ewes inseminated with frozen semen. *J Reprod Fertil.* 94:337-43.
- Mieusset, R., P.I. Quintana Casares, L.G. Sanchez-Partida, S.F. Sowerbutts, J.L. Zupp, and B.P. Setchell. 1991. The effects of moderate heating of the testes and epididymides of rams by scrotal insulation on body temperature, respiratory rate, spermatozoa output and motility, and on fertility and embryonic survival in ewes inseminated with frozen semen. *Ann N Y Acad Sci.* 637:445-58.
- Mittwoch, U. 1993. Blastocysts prepare for the race to be male. *Hum Reprod.* 8:1550-5.
- Moreira, P.N., P. Giraldo, P. Cozar, J. Pozueta, A. Jimenez, L. Montoliu, and A. Gutierrez-Adan. 2004. Efficient generation of transgenic mice with intact yeast artificial chromosomes by intracytoplasmic sperm injection. *Biol Reprod.* 71:1943-7.
- Moreira, P. N., M. Perez-Crespo, et al. 2007. Effect of Transgene Concentration, Flanking Matrix Attachment Regions, and RecA-Coating on the Efficiency of Mouse Transgenesis Mediated by Intracytoplasmic Sperm Injection. *Biol Reprod* 76(2): 336-43.
- Morrell, J.M., A. Johannisson, A.M. Dalin, L. Hammar, T. Sandebert, and H. Rodriguez-Martinez. 2008. Sperm morphology and chromatin integrity in Swedish warmblood stallions and their relationship to pregnancy rates. *Acta Vet Scand.* 50:2.
- Morris, I.D., S. Iltott, L. Dixon, and D.R. Brison. 2002. The spectrum of DNA damage in human sperm assessed by single cell gel electrophoresis (Comet assay) and its relationship to fertilization and embryo development. *Hum Reprod.* 17:990-8.
- Moskovtsev, S.I., J. Willis, A. Azad, and J.B. Mullen. 2005. Sperm DNA integrity: correlation with sperm plasma membrane integrity in semen evaluated for male infertility. *Arch Androl.* 51:33-40.
- Muratori, M., M. Maggi, S. Spinelli, E. Filimberti, G. Forti, and E. Baldi. 2003. Spontaneous DNA fragmentation in swim-up selected human spermatozoa during long term incubation. *J Androl.* 24:253-62.
- Nanassy, L., and D.T. Carrell. 2008. Paternal effects on early embryogenesis. *J Exp Clin Assist Reprod.* 5:2.

- Narendranath, R., and G.H. Kiracofe. 1975. Effects of heat--stress in rats. II. Factor(s) responsible for reduced embryonic and/or foetal survival percentage. *Indian J Physiol Pharmacol.* 19:140-5.
- Nasr-Esfahani, M.H., M. Salehi, S. Razavi, M. Anjomshoa, S. Rozbahani, F. Moulavi, and M. Mardani. 2005. Effect of sperm DNA damage and sperm protamine deficiency on fertilization and embryo development post-ICSI. *Reprod Biomed Online.* 11:198-205.
- Nicol, C.J., J. Zielenski, L.C. Tsui, and P.G. Wells. 2000. An embryoprotective role for glucose-6-phosphate dehydrogenase in developmental oxidative stress and chemical teratogenesis. *Faseb J.* 14:111-27.
- Oakberg, E.F. 1956. Duration of spermatogenesis in the mouse and timing of stages of the cycle of the seminiferous epithelium. *Am J Anat.* 99:507-16.
- Okamoto, I., A.P. Otte, C.D. Allis, D. Reinberg, and E. Heard. 2004. Epigenetic dynamics of imprinted X inactivation during early mouse development. *Science.* 303:644-9.
- Oliva, R. 2006. Protamines and male infertility. *Hum Reprod Update* 12(4):417-435.
- Ozawa, M., M. Hirabayashi, and Y. Kanai. 2002. Developmental competence and oxidative state of mouse zygotes heat-stressed maternally or in vitro. *Reproduction.* 124:683-9.
- Ozawa, M., T. Matsuzuka, M. Hirabayashi, and Y. Kanai. 2004. Redox status of the oviduct and CDC2 activity in 2-cell stage embryos in heat-stressed mice. *Biol Reprod.* 71:291-6.
- Ozmen, B., N. Koutlaki, M. Youssry, K. Diedrich, and S. Al-Hasani. 2007. DNA damage of human spermatozoa in assisted reproduction: origins, diagnosis, impacts and safety. *Reprod Biomed Online.* 14:384-95.
- Paul, C., A.A. Murray, N. Spears, and P.T. Saunders. 2008. A single, mild, transient scrotal heat stress causes DNA damage, subfertility and impairs formation of blastocysts in mice. *Reproduction.* 136:73-84.
- Paula-Lopes, F.F., and P.J. Hansen. 2002a. Apoptosis is an adaptive response in bovine preimplantation embryos that facilitates survival after heat shock. *Biochem Biophys Res Commun.* 295:37-42.
- Paula-Lopes, F.F., and P.J. Hansen. 2002b. Heat shock-induced apoptosis in preimplantation bovine embryos is a developmentally regulated phenomenon. *Biol Reprod.* 66:1169-77.
- Payne, J.F., D.J. Raburn, G.M. Couchman, T.M. Price, M.G. Jamison, and D.K. Walmer. 2005. Redefining the relationship between sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as measured by the sperm chromatin structure assay and outcomes of assisted reproductive techniques. *Fertil Steril.* 84:356-64.
- Pergament, E., M. Fiddler, N. Cho, D. Johnson, and W.J. Holmgren. 1994. Sexual differentiation and preimplantation cell growth. *Hum Reprod.* 9:1730-2.
- Pergament, E., P.B. Todydemir, and M. Fiddler. 2002. Sex ratio: a biological perspective of 'Sex and the City'. *Reprod Biomed Online.* 5:43-6.
- Peris, S.I., J.F. Bilodeau, M. Dufour, and J.L. Bailey. 2007. Impact of cryopreservation and reactive oxygen species on DNA integrity, lipid peroxidation, and functional parameters in ram sperm. *Mol Reprod Dev.* 74:878-92.
- Perreault, S.D., R.J. Aitken, H.W. Baker, D.P. Evenson, G. Huszar, D.S. Irvine, I.D. Morris, R.A. Morris, W.A. Robbins, D. Sakkas, M. Spano, and A.J. Wyrobek. 2003. Integrating new tests of sperm genetic integrity into semen analysis: breakout group discussion. *Adv Exp Med Biol.* 518:253-68.

- Print, C.G., and K.L. Loveland. 2000. Germ cell suicide: new insights into apoptosis during spermatogenesis. *Bioessays*. 22:423-30.
- Rieger, D. 1992. Relationships between energy metabolism and development of early mammalian. *Theriogenology*. 37:75-93.
- Rivera, R.M., K.L. Kelley, G.W. Erdos, and P.J. Hansen. 2003. Alterations in ultrastructural morphology of two-cell bovine embryos produced in vitro and in vivo following a physiologically relevant heat shock. *Biol Reprod*. 69:2068-77.
- Robaire, B., and B.F. Hales. 2003. Mechanisms of action of cyclophosphamide as a male-mediated developmental toxicant. *Adv Exp Med Biol*. 518:169-80.
- Rockett, J.C., F.L. Mapp, J.B. Garges, J.C. Luft, C. Mori, and D.J. Dix. 2001. Effects of hyperthermia on spermatogenesis, apoptosis, gene expression, and fertility in adult male mice. *Biol Reprod*. 65:229-39.
- Roche, J.R., J.M. Lee, and D.P. Berry. 2006. Climatic factors and secondary sex ratio in dairy cows. *J Dairy Sci*. 89:3221-7.
- Rodriguez-Martinez, H. 2007. State of the art in farm animal sperm evaluation. *Reprod Fertil Dev*. 19:91-101.
- Rodriguez-Martinez, H., and A.D. Barth. 2007. In vitro evaluation of sperm quality related to in vivo function and fertility. *Soc Reprod Fertil Suppl*. 64:39-54.
- Rubes, J., S.G. Selevan, D.P. Evenson, D. Zudova, M. Vozdova, Z. Zudova, W.A. Robbins, and S.D. Perreault. 2005. Episodic air pollution is associated with increased DNA fragmentation in human sperm without other changes in semen quality. *Hum Reprod*. 20:2776-83.
- Russell LD, Ettlin RA, SinhaHikim AP, Clegg ED, eds. *Histological and Histopathological Evaluation of the Testis*. Clearwater, Fla: Cache River Press; 1990: 1 -38.
- Ruvuna, F., J.F. Taylor, J.P. Walter, J.W. Turner, and R.M. Thallman. 1992. Bioeconomic evaluation of embryo transfer in beef production systems: I. Description of a biological model for steer production. *J Anim Sci*. 70:1077-83.
- Ryan, D.P., E.G. Blakewood, J.W. Lynn, L. Munyakazi, and R.A. Godke. 1992. Effect of heat-stress on bovine embryo development in vitro. *J Anim Sci*. 70:3490-7.
- Sailer, B.L., L.K. Jost, and D.P. Evenson. 1995. Mammalian sperm DNA susceptibility to in situ denaturation associated with the presence of DNA strand breaks as measured by the terminal deoxynucleotidyl transferase assay. *J Androl*. 16:80-7.
- Sailer, B.L., L.J. Sarkar, J.A. Bjordahl, L.K. Jost, and D.P. Evenson. 1997. Effects of heat stress on mouse testicular cells and sperm chromatin structure. *J Androl*. 18:294-301.
- Sakkas, D. 1999. The use of blastocyst culture to avoid inheritance of an abnormal paternal genome after ICSI. *Hum Reprod*. 14:4-5.
- Sakkas, D., E. Mariethoz, G. Manicardi, D. Bizzaro, P.G. Bianchi, and U. Bianchi. 1999. Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Rev Reprod*. 4:31-7.
- Sakkas, D., O. Moffatt, G.C. Manicardi, E. Mariethoz, N. Tarozzi, and D. Bizzaro. 2002. Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. *Biol Reprod*. 66:1061-7.
- Sakkas, D., F. Urner, D. Bizzaro, G. Manicardi, P.G. Bianchi, Y. Shoukir, and A. Campana. 1998. Sperm nuclear DNA damage and altered chromatin structure: effect on fertilization and embryo development. *Hum Reprod*. 13 Suppl 4:11-9.

- Saleh, R.A., A. Agarwal, R.K. Sharma, T.M. Said, S.C. Sikka, and A.J. Thomas, Jr. 2003. Evaluation of nuclear DNA damage in spermatozoa from infertile men with varicocele. *Fertil Steril*. 80:1431-6.
- Sartori, R., R. Sartor-Bergfelt, S.A. Mertens, J.N. Guenther, J.J. Parrish, and M.C. Wiltbank. 2002. Fertilization and early embryonic development in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. *J Dairy Sci*. 85:2803-12.
- Schultz, R.M. 2005. From egg to embryo: a peripatetic journey. *Reproduction*. 130:825-8.
- Sega, G.A. 1979. Unscheduled DNA synthesis (DNA repair) in the germ cells of male mice--its role in the study of mammalian mutagenesis. *Genetics*. 92:s49-58.
- Seiler, P., T.G. Cooper, and E. Nieschlag. 2000. Sperm number and condition affect the number of basal cells and their expression of macrophage antigen in the murine epididymis. *Int J Androl*. 23:65-76.
- Seli, E., D.K. Gardner, W.B. Schoolcraft, O. Moffatt, and D. Sakkas. 2004. Extent of nuclear DNA damage in ejaculated spermatozoa impacts on blastocyst development after in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 82:378-83.
- Seli, E., and D. Sakkas. 2005. Spermatozoal nuclear determinants of reproductive outcome: implications for ART. *Hum Reprod Update*. 11:337-49.
- Sergerie, M., G. Laforest, L. Bujan, F. Bissonnette, and G. Bleau. 2005. Sperm DNA fragmentation: threshold value in male fertility. *Hum Reprod*. 20:3446-51.
- Setchell, B.P. 1998. The Parkes Lecture. Heat and the testis. *J Reprod Fertil*. 114:179-94.
- Setchell, B.P., G. Ekpe, J.L. Zupp, and M.A. Surani. 1998. Transient retardation in embryo growth in normal female mice made pregnant by males whose testes had been heated. *Hum Reprod*. 13:342-7.
- Shaman, J.A., R. Prisztoka, and W.S. Ward. 2006. Topoisomerase IIb and an extracellular nuclease interact to digest sperm DNA in an apoptotic-like manner. *Biol Reprod*. 75:741-8.
- Sharma, R., Said, TM, Agarwal, A 2004. Sperm DNA damage and its clinical relevance in assessing reproductive outcome. *Asian J Androl*. 6:139-148.
- Sharma, R.K., T. Said, and A. Agarwal. 2004. Sperm DNA damage and its clinical relevance in assessing reproductive outcome. *Asian J Androl*. 6:139-48.
- Shimura, T., M. Inoue, M. Taga, K. Shiraishi, N. Uematsu, N. Takei, Z.M. Yuan, T. Shinohara, and O. Niwa. 2002a. p53-dependent S-phase damage checkpoint and pronuclear cross talk in mouse zygotes with X-irradiated sperm. *Mol Cell Biol*. 22:2220-8.
- Shimura, T., M. Toyoshima, M. Taga, K. Shiraishi, N. Uematsu, M. Inoue, and O. Niwa. 2002b. The novel surveillance mechanism of the Trp53-dependent s-phase checkpoint ensures chromosome damage repair and preimplantation-stage development of mouse embryos fertilized with x-irradiated sperm. *Radiat Res*. 158:735-42.
- Singh, N.P., M.T. McCoy, R.R. Tice, and E.L. Schneider. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*. 175:184-91.
- Skinner, J.D., and G.N. Louw. 1966. Heat stress and spermatogenesis in *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle. *J Appl Physiol*. 21:1784-90.
- Sotolongo, B., T.T. Huang, E. Isenberger, and W.S. Ward. 2005. An endogenous nuclease in hamster, mouse, and human spermatozoa cleaves DNA into loop-sized fragments. *J Androl*. 26:272-80.

- Sotomayor, R.E., and G.A. Sega. 2000. Unscheduled DNA synthesis assay in mammalian spermatogenic cells: an update. *Environ Mol Mutagen.* 36:255-65.
- Spano, M., J.P. Bonde, H.I. Hjollund, H.A. Kolstad, E. Cordelli, and G. Leter. 2000. Sperm chromatin damage impairs human fertility. The Danish First Pregnancy Planner Study Team. *Fertil Steril.* 73:43-50.
- Spano, M., E. Seli, D. Bizzaro, G.C. Manicardi, and D. Sakkas. 2005. The significance of sperm nuclear DNA strand breaks on reproductive outcome. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 17:255-60.
- Suarez, S.S. 2007. Interactions of spermatozoa with the female reproductive tract: inspiration for assisted reproduction. *Reprod Fertil Dev.* 19:103-10.
- Sun, J.G., A. Jurisicova, and R.F. Casper. 1997. Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro. *Biol Reprod.* 56:602-7.
- Szczygiel, M.A., S. Moisyadi, and W.S. Ward. 2003. Expression of foreign DNA is associated with paternal chromosome degradation in intracytoplasmic sperm injection-mediated transgenesis in the mouse. *Biol Reprod.* 68:1903-10.
- Szczygiel, M.A., and W.S. Ward. 2002. Combination of dithiothreitol and detergent treatment of spermatozoa causes paternal chromosomal damage. *Biol Reprod.* 67:1532-7.
- Takahashi, M., N. Saka, H. Takahashi, Y. Kanai, R.M. Schultz, and A. Okano. 1999. Assessment of DNA damage in individual hamster embryos by comet assay. *Mol Reprod Dev.* 54:1-7.
- Tarin, J.J., J. Brines, and A. Cano. 1998. Long-term effects of delayed parenthood. *Hum Reprod.* 13:2371-6.
- Tarin, J.J., S. Perez-Albala, and A. Cano. 2000. Consequences on offspring of abnormal function in ageing gametes. *Hum Reprod Update.* 6:532-49.
- Tateno, H., Y. Kimura, and R. Yanagimachi. 2000. Sonication per se is not as deleterious to sperm chromosomes as previously inferred. *Biol Reprod.* 63:341-6.
- Taylor, J., H. Fairburn, N. Beaujean, R. Meehan, and L. Young. 2003. Gene expression in the developing embryo and fetus. *Reprod Suppl.* 61:151-65.
- Tejada, R.I., J.C. Mitchell, A. Norman, J.J. Marik, and S. Friedman. 1984. A test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescence. *Fertil Steril.* 42:87-91.
- Tesarik, J., E. Greco, and C. Mendoza. 2004. Late, but not early, paternal effect on human embryo development is related to sperm DNA fragmentation. *Hum Reprod.* 19:611-5.
- Tesarik, J., R. Mendoza-Tesarik, and C. Mendoza. 2006. Sperm nuclear DNA damage: update on the mechanism, diagnosis and treatment. *Reprod Biomed Online.* 12:715-21.
- Thonneau, P., L. Bujan, L. Multigner, and R. Mieuisset. 1998. Occupational heat exposure and male fertility: a review. *Hum Reprod.* 13:2122-5.
- Tomlinson, M.J., O. Moffatt, G.C. Manicardi, D. Bizzaro, M. Afnan, and D. Sakkas. 2001. Interrelationships between seminal parameters and sperm nuclear DNA damage before and after density gradient centrifugation: implications for assisted conception. *Hum Reprod.* 16:2160-5.
- Trivers, R.L., and D.E. Willard. 1973. Natural selection of parental ability to vary the sex ratio of offspring. *Science.* 179:90-2.
- Tsuchiya, K.D., and H.F. Willard. 2000. Chromosomal domains and escape from X inactivation: comparative X inactivation analysis in mouse and human. *Mamm Genome.* 11:849-54.

- Twigg, J.P., D.S. Irvine, and R.J. Aitken. 1998. Oxidative damage to DNA in human spermatozoa does not preclude pronucleus formation at intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 13:1864-71.
- Valdivia, R.P., T. Kunieda, S. Azuma, and Y. Toyoda. 1993. PCR sexing and developmental rate differences in preimplantation mouse embryos fertilized and cultured in vitro. *Mol Reprod Dev.* 35:121-6.
- Van der Auwera, I., R. Pijnenborg, and P.R. Koninckx. 1999. The influence of in-vitro culture versus stimulated and untreated oviductal environment on mouse embryo development and implantation. *Hum Reprod.* 14:2570-4.
- Van Langendonckt, A., A. Vansteenbrugge, I. Donnay, A. Van Soom, U. Berg, E. Semple, B. Grisart, P. Mermillod, G. Brem, A. Massip, and F. Dessy. 1996. Three year results of in vitro production of bovine embryos in serum-poor bovine oviduct conditioned medium. An overview. *Reprod Nutr Dev.* 36:493-502.
- Viloria, T., M.C. Rubio, L. Rodrigo, G. Calderon, A. Mercader, E. Mateu, M. Meseguer, J. Remohi, and A. Pellicer. 2005. Smoking habits of parents and male: female ratio in spermatozoa and preimplantation embryos. *Hum Reprod.* 20:2517-22.
- Virro, M.R., K.L. Larson-Cook, and D.P. Evenson. 2004. Sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters are related to fertilization, blastocyst development, and ongoing pregnancy in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertil Steril.* 81:1289-95.
- Walker, S.K., K.M. Hartwich, and J.S. Robinson. 2000. Long-term effects on offspring of exposure of oocytes and embryos to chemical and physical agents. *Hum Reprod Update.* 6:564-77.
- Walters, A.H., R.G. Saacke, R.E. Pearson, and F.C. Gwazdauskas. 2006. Assessment of pronuclear formation following in vitro fertilization with bovine spermatozoa obtained after thermal insulation of the testis. *Theriogenology.* 65:1016-28.
- Wang, P.J., D.C. Page, and J.R. McCarrey. 2005. Differential expression of sex-linked and autosomal germ-cell-specific genes during spermatogenesis in the mouse. *Hum Mol Genet.* 14:2911-8.
- Wang, X., R.K. Sharma, S.C. Sikka, A.J. Thomas, Jr., T. Falcone, and A. Agarwal. 2003. Oxidative stress is associated with increased apoptosis leading to spermatozoa DNA damage in patients with male factor infertility. *Fertil Steril.* 80:531-5.
- Ward, M.A., and W.S. Ward. 2004. A model for the function of sperm DNA degradation. *Reprod Fertil Dev.* 16:547-54.
- Ward, W.S., and D.S. Coffey. 1989. Identification of a sperm nuclear annulus: a sperm DNA anchor. *Biol Reprod.* 41:361-70.
- Ward, W.S., and D.S. Coffey. 1991. DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. *Biol Reprod.* 44:569-74.
- Ward, W.S., A.W. Partin, and D.S. Coffey. 1989. DNA loop domains in mammalian spermatozoa. *Chromosoma.* 98:153-9.
- Ward, W.S., and A.O. Zalensky. 1996. The unique, complex organization of the transcriptionally silent sperm chromatin. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 6:139-47.
- Watkins, A.J., E. Ursell, R. Panton, T. Papenbrock, L. Hollis, C. Cunningham, A. Wilkins, V.H. Perry, B. Sheth, W.Y. Kwong, J.J. Eckert, A.E. Wild, M.A. Hanson, C. Osmond, and T.P. Fleming. 2008. Adaptive responses by mouse early embryos to maternal diet protect fetal growth but predispose to adult onset disease. *Biol Reprod.* 78:299-306.

- Wells, P.G., P.M. Kim, R.R. Laposa, C.J. Nicol, T. Parman, and L.M. Winn. 1997. Oxidative damage in chemical teratogenesis. *Mutat Res.* 396:65-78.
- Wildt, D.E., G.D. Riegle, and W.R. Dukelow. 1975. Physiological temperature response and embryonic mortality in stressed swine. *Am J Physiol.* 229:1471-5.
- Wood, T. 1985. The Pentose Phosphate Pathway. *New York. Academic Press Inc.*
- Woody, C.O., and L.C. Ulberg. 1964. Viability of One-Cell Sheep Ova as Affected by High Environmental Temperature. *J Reprod Fertil.* 7:275-80.
- Wrenzycki, C., A. Lucas-Hahn, D. Herrmann, E. Lemme, K. Korsawe, and H. Niemann. 2002. In vitro production and nuclear transfer affect dosage compensation of the X-linked gene transcripts G6PD, PGK, and Xist in preimplantation bovine embryos. *Biol Reprod.* 66:127-34.
- Yaeram, J., B.P. Setchell, and S. Maddocks. 2006. Effect of heat stress on the fertility of male mice in vivo and in vitro. *Reprod Fertil Dev.* 18:647-53.
- Yamauchi, Y., A. Ajduk, J.M. Riel, and M.A. Ward. 2007. Ejaculated and epididymal mouse spermatozoa are different in their susceptibility to nuclease-dependent DNA damage and in their nuclease activity. *Biol Reprod.* 77:636-47.
- Yildiz, C., P. Ottaviani, N. Law, R. Ayearst, L. Liu, and C. McKelvie. 2007. Effects of cryopreservation on sperm quality, nuclear DNA integrity, in vitro fertilization, and in vitro embryo development in the mouse. *Reproduction.* 133:585-95.
- Yin, Y., K.L. Hawkins, W.C. DeWolf, and A. Morgentaler. 1997. Heat stress causes testicular germ cell apoptosis in adult mice. *J Androl.* 18:159-65.
- Young, L.E., K.D. Sinclair, and I. Wilmut. 1998. Large offspring syndrome in cattle and sheep. *Rev Reprod.* 3:155-63.
- Zaccagnini, G., B. Maione, R. Lorenzini, and C. Spadafora. 1998. Increased production of mouse embryos in in vitro fertilization by preincubating sperm cells with the nuclease inhibitor aurintricarboxylic acid. *Biol Reprod.* 59:1549-53.
- Zheng, P., R.D. Schramm, and K.E. Latham. 2005. Developmental regulation and in vitro culture effects on expression of DNA repair and cell cycle checkpoint control genes in rhesus monkey oocytes and embryos. *Biol Reprod.* 72:1359-69.
- Zhu, B., and S. Maddocks. 2005. The effect of paternal heat stress on protein profiles of pre-implantation embryos in the mouse. *Int J Androl.* 28:128-36.
- Zhu, B., S.K. Walker, H. Oakey, B.P. Setchell, and S. Maddocks. 2004. Effect of paternal heat stress on the development in vitro of preimplantation embryos in the mouse. *Andrologia.* 36:384-94.
- Zhu, B.K., and B.P. Setchell. 2004. Effects of paternal heat stress on the in vivo development of preimplantation embryos in the mouse. *Reprod Nutr Dev.* 44:617-29.
- Zini, A., R. Bielecki, D. Phang, and M.T. Zenzes. 2001. Correlations between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation, in fertile and infertile men. *Fertil Steril.* 75:674-7.
- Zini, A., and J. Libman. 2006. Sperm DNA damage: clinical significance in the era of assisted reproduction. *Cmaj.* 175:495-500.
- Zini, A., J. Meriano, K. Kader, K. Jarvi, C.A. Laskin, and K. Cadesky. 2005. Potential adverse effect of sperm DNA damage on embryo quality after ICSI. *Hum Reprod.* 20:3476-80.



Zwingman, T., R.P. Erickson, T. Boyer, and A. Ao. 1993. Transcription of the sex-determining region genes Sry and Zfy in the mouse preimplantation embryo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90:814-7.

## **ANEXO I. ABREVIATURAS**



**ADN:** ácido desoxiribonucleico

**ARNm:** ácido ribonucleico mensajero

**Bax:** gen y ARNm de Bcl-2 ligado al cromosoma X (Bcl-2 associated X-linked protein)

**CMA3:** cromomicina A3

**DAPI:** 4,6 diamino-2-phenylindole

**DBD-FISH:** detección mediante hibridación in situ de roturas del ADN (DNA Breakage Detection-Fluorescence In Situ Hybridization)

**Dsc2:** gen y ARNm de la desmocolina II (desmocholin II), también conocido con DcII.

**DCHFDA:** diacetato de 2', 7' - diclorodihidrofluoresceína.

**DHEA:** dehidroepiandrosterona

**Dnmt3a y Dnmt3 :** ADN metiltransferasa 3a y 3b (DNA methyltransferase 3a y 3b)

**DTT:** dithiothreitol

**dUTP:** desoxiuridina trifosfato

**EDTA:** ácido dietilen-aminotetraacético (Ethylenediaminetetraacetic acid)

**EGTA:** etilen glicol del ácido tetracético (Ethylene glycol tetraacetic acid)

**Enzima TdT:** enzima desoxinucleotidil transferasa terminal

**FIV:** fecundación *in vitro*

**G6PD:** enzima glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase)

**G6PD o G6pdx:** gen y ARNm de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa ligado al cromosoma X (Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase X-linked)

**GSH:** glutathione

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** Peróxido de hidrógeno

**Hmt1:** hnRNP methyltransferase-like 1

**HPRT o Hprt:** gen y ARNm de hipoxantina fosforribosil transferasa ( Hypoxanthine phosphoribosyl transferase)

**HR:** humedad relativa

**HSP70:** Proteína de choque térmico 70kDa(Heat shock proteína 70)

**ICM:** masa celular interna (Inner Cell Mass)

**ICSI:** inyección intracitoplasmática de espermatozoides (Intracytoplasmic Sperm Injection)

**IP:** Ioduro de Propidio

**ISNT:** Marcaje interno mediante desplazamiento de mella (In Situ Nick Translation)

**KSOM:** Kalium(K<sup>+</sup>)Simplex Optimized Medium

**MC:** medio condicionado

**NADPH:** nicotiamida-adenina dinucleótido fosfato

**Na/K:** gen y ARNm de ATPasa sodio-potasio

**Oct-4:** gen y ARNm de octámero-4 (Octamer-4)

**PCR:** reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction)

**PPP:** ruta de las pentosas fosfato (Pentose Phosphate Pathway)

**PIV:** producción *in vitro* de embriones

**qPCR:** reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (en tiempo real) (Quantitative Polymerase Chain Reaction)

**RLO:** radicales libres de oxígeno

**RT-qPCR:** PCR cuantitativa asociada a retrotranscripción (Quantitative Reverse Transcription–PCR)

**SCD Test:** test de dispersión de la cromatina (Sperm Chromatin Dispersion Test).

**SCGE:** electroforesis de células individuales para el análisis del ADN (Single Cell Gel Electrophoresis)

**SCSA:** análisis de la estructura de la cromatina del espermatozoide (Sperm Chromatin Sperm Analysis)

**Sox:** gen y ARNm de sarcosina oxidasa (Sarcosine Oxidase)

**Sry:** gen de la región determinante del sexo del cromosoma Y (Sex Region Y-chromosome)

**TUNEL:** marcaje del ADN en el extremo 3' terminal mediado por la enzima deoxinucleotidil transferasa (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick-End Labelling)

**TRA:** técnicas de reproducción asistida

**XIAP o Xiap:** gen y ARNm de inhibidor de apoptosis unido al cromosoma X (X-linked inhibitor of apoptosis protein)

## **ANEXO II. ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS**



## FIGURAS

<b>Fig 3.1.</b> Representación esquemática de la inactivación del cromosoma X en embriones de sexo femenino .....	15
<b>Fig 3.2.</b> Representación esquemática de la espermatogénesis en el ratón .....	24
<b>Fig 3.3.</b> Modelo de compactación de la cromatina en las células somáticas y en los espermatozoides de mamífero .....	28
<b>Fig 4.1.</b> Representación esquemática de los protocolos correspondientes a los experimentos 4.1 y 4.2. ....	45
<b>Fig 4.2.</b> Representación esquemática del protocolo correspondiente al experimento 4.3 .....	46
<b>Fig 4.3.</b> Representación esquemática del protocolo correspondiente al experimento 4.4 .....	47
<b>Fig 4.4.</b> Representación esquemática del protocolo correspondiente al experimento 4.5. ....	48
<b>Fig 4.5.</b> Representación esquemática de los estadios del desarrollo preimplantacional .....	49
<b>Fig 5.1.</b> Representación esquemática de los protocolos correspondientes a los experimentos 5.1, 5.2 y 5.3. ....	67
<b>Fig 5.2.</b> Células de la línea germinal masculina afectadas por el estrés térmico.....	68
<b>Fig 6.1.</b> Representación esquemática del protocolo correspondiente al experimento 6.2. ....	83

## TABLAS

<b>Tabla 3.1.</b> Técnicas más comunes utilizadas para la detección de anomalías en la cromatina espermática .....	35
--	----





### **ANEXO III.PUBLICACIONES**



## **PUBLICACIONES**

### **Capítulos de libro**

**M Pérez-Crespo**, J Hourcade, R Fernandez-Gonzalez, MA Ramirez and A Gutierrez-Adan *The impact of sperm DNA integrity on embryo quality and development in the era of assisted reproduction: Lessons from the Mouse*. Capítulo en: Reviews on Basic Andrology. Editores: M<sup>a</sup>Isabel Arenas y M<sup>a</sup>Val T.Lobo. Research Signpost. 2007. pp169-181.

E Pericuesta, M<sup>a</sup> Ramírez, R Fernández-González, **M Pérez-Crespo**, J Hourcade, P Bermejo, D Rizo, and A Gutiérrez Adán. *Telomere lengthening from oocyte to embryonic stem cell*. Capítulo en: Telomeres: Function, Shortening and Lengthening. Editor Leonardo Mancini. 2009. Nova Science Publishers, Inc.

### **Artículos en revistas incluidas en Science Citation Index (SCI)**

R Fernández-González., P Moreira., A Bilbao., A Jiménez., **M Pérez-Crespo**., M A Ramírez., F Rodríguez De Fonseca., B Pintado and A Gutiérrez-Adán (2004) Long-term effect of in vitro culture of mouse embryos with serum on mRNA expression of imprinting genes, development, and behavior. *Proceeding of the National Academic of Science* 101(16), 5880-5885.

PN Moreira , R Fernández-González , D Rizo , M Ramírez , **M Pérez-Crespo**, and A Gutiérrez-Adán (2005) Inadvertent transgenesis by conventional ICSI in mice . *Human Reproduction* 20(12), 3313–3317.

**M. Pérez-Crespo** , M. A. Ramírez , R. Fernández-González , D. Rizo , P. Lonergan , B. Pintado , A. Gutiérrez-Adán (2005) Differential sensitivity of male and female mouse embryos to oxidative induced heat-stress is mediated by glucose-6-phosphate dehydrogenase gene expression. *Molecular Reproduction and Development* 72 (4), 502-510.

P.N. Moreira, R. Fernández-Gonzalez, M. A. Ramírez, **M. Pérez-Crespo**, D. Rizo, B. Pintado and A. Gutiérrez-Adán (2006) Differential effects of culture and nuclear transfer on relative transcript levels of genes with key roles during pre-implantation. *Zygote* 14(1), 81-87.

A Gutiérrez-Adán, **M Pérez-Crespo**, R Fernandez-Gonzalez, MA Ramirez, P Moreira, B Pintado, P Lonergan, D Rizo (2006) Developmental Consequences of Sexual Dimorphism During Pre-implantation Embryonic Development. *Reproduction in Domestic Animals* 41(2), 54-62.

P N Moreira, **M Pérez-Crespo**, MA Ramírez, J Pozueta, Ll. Montoliu, and A Gutiérrez-Adán (2007) Effect of Transgene Concentration, Flanking Matrix Attachment Regions, and RecA-Coating on the Efficiency of Mouse Transgenesis Mediated by Intracytoplasmic Sperm Injection. *Biology of Reproduction* 76, 336-343.

PN Moreira, J Pozueta , **M Pérez-Crespo**, F Valdivieso, A Gutiérrez-Adán and Lluís Montoliu (2007) Improving the generation of genomic-type transgenic mice by ICSI. *Transgenic Research* 16(2), 163-168.

**M. Pérez-Crespo**, B. Pintado , A. Gutiérrez-Adán (2008) Scrotal Heat Stress Effects on Sperm Viability, Sperm DNA Integrity and the Offspring Sex Ratio in Mice. *Molecular Reproduction and Development* 75(1), 40-47.

**M. Pérez-Crespo**, P. Moreira, B. Pintado, A. Gutiérrez-Adán (2008) Factors from damaged sperm affect its DNA integrity and its ability to promote embryo implantation in mice. *Journal of Andrology* 29 (1), 47-54.

Fernández-González, R., Moreira, P. N., **Pérez-Crespo, M.**, Sanchez-Martin, M., Ramirez, M. A., Pericuesta, E., Bilbao, A., Bermejo-Alvarez, P., Hourcade J.D., Fonseca, F., Gutierrez-Adan, A. (2008) Long-Term Effects of Mouse Intracytoplasmic Sperm Injection with DNA-Fragmented Sperm on Health and Behavior of Adult Offspring. *Biology of Reproduction* 78, 761-772.

MA Ramírez, R Fernández-González, **M Pérez-Crespo**, E Pericuesta, and A Gutiérrez-Adán (2009) Effect of stem cell activation, culture media of manipulated embryos, and site of embryo transfer in the production of FO embryonic stem cells mice. *Biology of Reproduction* (En prensa).



